(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-501758
(P2011-501758A)
(43)公表日　平成23年1月13日(2011.1.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	ZNA	4B024
C12N 15/113	(2010.01)	C12N	15/00	G	4B063
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4C084
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4C085
C07K 16/32	(2006.01)	C07K	16/32		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 68 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-530332 (P2010-530332)
(86)(22)出願日　平成20年10月22日 (2008.10.22)
(85)翻訳文提出日　平成22年6月23日 (2010.6.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2008/008924
(87)国際公開番号　WO2009/053041
(87)国際公開日　平成21年4月30日 (2009.4.30)
(31)優先権主張番号　07020730.3
(32)優先日　平成19年10月23日 (2007.10.23)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　504346260
ガニメド　ファーマシューティカルズ　アーゲー
ドイツ連邦共和国　５５１３１　マインツ、フライリヒラートシュトラーセ　１２
(71)出願人　509256849
ヨハネス　グーテンベルグ－ウニヴェリジテート　マインツ
ＪＯＨＡＮＮＥＳ　ＧＵＴＥＮＢＥＲＧ－ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＡＥＴ　ＭＡＩＮＺ
ドイツ連邦共和国　５５１２２　マインツ　サールシュトラーセ　２１
Ｓａａｒｓｔｒａｓｓｅ　２１，　５５１２２　Ｍａｉｎｚ，　Ｇｅｒｍａｎｙ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】診断及び治療のための腫瘍関連マーカーの同定

(57)【要約】
本発明は、その発現が癌疾患に関連する遺伝子産物に関する。本発明はまた、該遺伝子産物が発現される又は異常発現される疾患、特に癌疾患の治療及び診断に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（Ｉ）腫瘍関連抗原の発現若しくは活性を阻害する、及び／又は、
（ＩＩ）腫瘍阻害活性を有し、腫瘍関連抗原を発現する若しくは異常発現する細胞に選択的である、及び／又は、
（ＩＩＩ）投与したとき、ＭＨＣ分子と腫瘍関連抗原若しくはその一部との間の複合体の量を選択的に増加させる、
薬剤を含有する医薬組成物であって、前記腫瘍関連抗原が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる配列を有する、医薬組成物。
【請求項２】
（ＩＩ）の前記薬剤が、細胞死の誘導、細胞増殖の低減、細胞膜への損傷又はサイトカインの分泌を生じさせる、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
（Ｉ）又は（ＩＩ）の前記薬剤が、前記腫瘍関連抗原をコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項４】
（Ｉ）又は（ＩＩ）の前記薬剤が、前記腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体である、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項５】
前記薬剤が、
（ｉ）腫瘍関連抗原又はその一部、
（ｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸、
（ｉｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部に結合する抗体、
（ｉｖ）腫瘍関連抗原をコードする核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸、
（ｖ）腫瘍関連抗原をコードする核酸に対するｓｉＲＮＡ、
（ｖｉ）腫瘍関連抗原又はその一部を発現する宿主細胞、及び、
（ｖｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部とＭＨＣ分子との間の単離複合体、
から成る群より選択される１又はそれ以上の成分を含有する、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項６】
前記薬剤が、各々異なる腫瘍関連抗原の発現若しくは活性を選択的に阻害する、各々異なる腫瘍関連抗原を発現する若しくは異常発現する細胞に選択的である、又はＭＨＣ分子と種々の異なる腫瘍関連抗原若しくはその一部との間の複合体の量を増加させる、２又はそれ以上の薬剤を含み、前記腫瘍関連抗原の少なくとも１つが、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸
から成る群より選択される核酸によってコードされる配列を有する、請求項１に記載の医

薬組成物。
【請求項７】
（ｉ）腫瘍関連抗原又はその一部、
（ｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸、
（ｉｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部に結合する抗体、
（ｉｖ）腫瘍関連抗原をコードする核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸、
（ｖ）腫瘍関連抗原をコードする核酸に対するｓｉＲＮＡ、
（ｖｉ）腫瘍関連抗原又はその一部を発現する宿主細胞、及び、
（ｖｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部とＭＨＣ分子との間の単離複合体、
から成る群より選択される１又はそれ以上の成分を含有する医薬組成物であって、前記腫瘍関連抗原が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる配列を有する、医薬組成物。
【請求項８】
（ｉｉ）の核酸が発現ベクター内に存在する、請求項５又は７に記載の医薬組成物。
【請求項９】
前記宿主細胞が前記腫瘍関連抗原又はその一部を分泌する、請求項５又は７に記載の医薬組成物。
【請求項１０】
前記宿主細胞が、前記腫瘍関連抗原又はその一部に結合するＭＨＣ分子を付加的に発現する、請求項５又は７に記載の医薬組成物。
【請求項１１】
宿主細胞が、前記ＭＨＣ分子及び／又は前記腫瘍関連抗原若しくはその一部を組換えによって発現する、請求項１０に記載の医薬組成物。
【請求項１２】
前記宿主細胞が前記ＭＨＣ分子を内因的に発現する、請求項１０に記載の医薬組成物。
【請求項１３】
前記宿主細胞が抗原提示細胞である、請求項５、７、１０又は１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体であるか、又は抗体のフラグメントである、請求項４、５又は７に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
前記抗体が治療薬又は診断薬に連結されている、請求項４、５、７又は１４に記載の医薬組成物。
【請求項１６】
癌の治療又は予防のために使用し得る、請求項１から１５のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項１７】
前記癌が、肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、黒色腫、結腸腫瘍、胃腫瘍、膵腫瘍、ＥＮＴ腫瘍、卵巣腫瘍、結腸直腸腫瘍、子宮頸癌、結腸癌又は乳癌である、請求項１６に記載の医薬組成物。
【請求項１８】

ワクチンの形態である、請求項１、２、５から１３、１６及び１７のいずれかに記載の医薬組成物。
【請求項１９】
治療及び／又は予防用途のための、請求項１８に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
（ｉ）腫瘍関連核酸又はその一部、及び／又は、
（ｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部、及び／又は、
（ｉｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部に対する抗体、及び／又は、
（ｉｖ）患者から単離した生物学的試料中の腫瘍関連抗原又はその一部に特異的なＴリンパ球、
を検出する又はその量を測定する工程を含む、癌疾患を診断する又は観測する方法であって、前記腫瘍関連核酸が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択されており、
前記腫瘍関連抗原が、前記核酸の群から選択される核酸によってコードされる配列を有する、癌疾患を診断する又は観測する方法。
【請求項２１】
前記検出又はその量を測定する工程が、
（ｉ）生物学的試料を、腫瘍関連核酸若しくはその一部、腫瘍関連抗原若しくはその一部、抗体又はＴリンパ球に特異的に結合する薬剤と接触させる工程、及び
（ｉｉ）薬剤と、核酸若しくはその一部、腫瘍関連抗原若しくはその一部、抗体又はＴリンパ球との間の複合体の形成を検出する工程又は該複合体の量を測定する工程、
を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記腫瘍関連核酸又はその一部に特異的に結合する前記薬剤が、前記核酸又は前記その一部に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドである、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記腫瘍関連抗原又はその一部に特異的に結合する前記薬剤が、前記腫瘍関連抗原又は前記その一部に特異的に結合する抗体である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
前記抗体に特異的に結合する前記薬剤が、前記抗体に特異的に結合するタンパク質又はペプチドである、請求項２１に記載の方法。
【請求項２５】
前記Ｔリンパ球に特異的に結合する薬剤が、前記腫瘍関連抗原又はその一部とＭＨＣ分子との間の複合体を提示する細胞である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２６】
前記疾患を観測する方法が、前記疾患を有する又は前記疾患に罹患することが疑われる患者からの試料において前記疾患の後退、経過又は発症を測定することを含む、請求項２０から２５のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
第１時点での第１試料における検出又は量の測定する工程、及び第２時点でのさらなる試料における検出及び量の測定する工程、並びに２つの試料の比較する工程を含む、請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】
前記薬剤が検出可能に標識されている、請求項２１から２７のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記試料が体液及び／又は体組織を含む、請求項２０から２８のいずれかに記載の方法。
【請求項３０】
前記癌疾患が、前記腫瘍関連核酸の発現又は異常発現によって特徴づけられる、請求項２０から２９のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
前記癌疾患が、前記腫瘍関連核酸によってコードされる腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によってさらに特徴づけられる、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
請求項１から１９のいずれかに記載の医薬組成物の投与を含む、腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患を治療する又は予防する方法であって、前記腫瘍関連抗原が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる配列を有する、方法。
【請求項３３】
前記腫瘍関連抗原又はその一部に結合し、且つ治療薬又は診断薬に連結されている抗体を投与することを含む、腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患を治療する、予防する、診断する又は観測する方法であって、前記腫瘍関連抗原が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる配列を有する、方法。
【請求項３４】
前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体であるか、又は抗体のフラグメントである、請求項２３又は３３に記載の方法。
【請求項３５】
腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患を有する患者を治療する方法であって、
（ｉ）免疫反応性細胞を含む試料を提供すること、
（ｉｉ）前記試料を、前記腫瘍関連抗原又は前記その一部に対する細胞溶解性又はサイトカイン放出性Ｔ細胞の産生を促進する条件下で、前記腫瘍関連抗原又はその一部を発現する宿主細胞と接触させること、及び
（ｉｉｉ）細胞溶解性又はサイトカイン放出性Ｔ細胞を、腫瘍関連抗原又はその一部を発現する細胞を溶解するために適切な量で前記患者に導入すること
を含み、前記腫瘍関連抗原が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９

９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる配列を有する、方法。
【請求項３６】
前記宿主細胞が、腫瘍関連抗原又はその一部に結合するＭＨＣ分子を組換え発現する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記宿主細胞が、腫瘍関連抗原又はその一部に結合するＭＨＣ分子を内因的に発現する、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
請求項１から１９のいずれかに記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む、患者において癌の発現を抑制する方法。
【請求項３９】
タンパク質又はポリペプチド又はその一部に特異的に結合する薬剤であって、前記タンパク質又はポリペプチドが、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる、薬剤。
【請求項４０】
抗体である、請求項３９に記載の薬剤。
【請求項４１】
前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体であるか、又は抗体のフラグメントである、請求項４０に記載の薬剤。
【請求項４２】
（ｉ）タンパク質又はポリペプチド又はその一部と、
（ｉｉ）前記タンパク質又はポリペプチド又はその一部が結合するＭＨＣ分子、
との複合体に選択的に結合し、（ｉ）又は（ｉｉ）単独には結合しない抗体であって、前記タンパク質又はポリペプチドが、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択される核酸によってコードされる、抗体。
【請求項４３】
モノクローナル抗体、キメラ抗体若しくはヒト化抗体であるか、又は抗体のフラグメントである、請求項４２に記載の抗体。
【請求項４４】
請求項３９から４１のいずれかに記載の薬剤又は請求項４２から４３のいずれかに記載の抗体と、治療薬又は診断薬との間のコンジュゲート。

【請求項４５】
前記治療薬又は前記診断薬が毒素である、請求項４４に記載のコンジュゲート。
【請求項４６】
癌を検出するためのキットであって、
（ｉ）腫瘍関連核酸又はその一部、及び／又は
（ｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部、及び／又は
（ｉｉｉ）腫瘍関連抗原又はその一部に結合する抗体、及び／又は
（ｉｖ）腫瘍関連抗原又はその一部とＭＨＣ分子との間の複合体に特異的なＴ細胞
を検出する又はその量を測定するための薬剤を含み、前記腫瘍関連核酸が、
（ａ）配列番号５４１、１～５４０、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、
（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の前記核酸とハイブリダイズする核酸、
（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の前記核酸に関して縮重している核酸、並びに、
（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の前記核酸に相補的である核酸、
から成る群より選択されており、
前記腫瘍関連抗原が、前記核酸の群から選択される核酸によってコードされる配列を有する、キット。
【請求項４７】
前記腫瘍関連抗原が、配列番号５４２、５４６、５５０、５５４、５６７、５７１、５８４、５８８、５９２、５９６、６０３、６０７、６１４、６２１及び６２５から成る群より選択されるアミノ酸配列、その一部又は誘導体を含む、請求項１から１９のいずれかに記載の医薬組成物、又は請求項２０から３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４８】
前記タンパク質又はポリペプチドが、配列番号５４２、５４６、５５０、５５４、５６７、５７１、５８４、５８８、５９２、５９６、６０３、６０７、６１４、６２１及び６２５から成る群より選択されるアミノ酸配列、その一部又は誘導体を含む、請求項３９から４１のいずれかに記載の薬剤、請求項４２から４３のいずれかに記載の抗体、又は請求項４４から４５のいずれかに記載のコンジュゲート。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、癌において発現される核酸及びコードされるポリペプチドに関する。本発明はまた、ポリペプチドに結合する薬剤に関する。核酸、そのような核酸によってコードされるポリペプチド及びそれに由来するペプチド、並びに関連する抗体及び細胞溶解性Ｔリンパ球は、中でも特に、診断及び治療関係において有用である。
【背景技術】
【０００２】
学際的なアプローチ及び古典的治療法の網羅的な使用にもかかわらず、癌は現在もなお死亡の主要原因の１つである。
【０００３】
癌治療におけるごく最近の治療概念は、組換え腫瘍ワクチン及び抗体療法のような他の特異的手段を使用することによって、患者の免疫系を全体的な治療の概念に組み込むことを目指す。そのような方策の成功のための前提条件は、腫瘍特異的又は腫瘍関連抗原又はエピトープが、そのエフェクター機能を介入措置によって増強しようとする患者の免疫系によって認識されることである。
【０００４】
腫瘍細胞は、それらの起源である非悪性細胞とは生物学的に実質上異なる。これらの相違は、腫瘍の発現の間に獲得される遺伝的変化によるものであり、中でも特に、癌細胞に

おける質的又は量的に変化した分子構造体の形成も生じさせる。腫瘍を保持する宿主の特異的免疫系によって認識されるこの種の腫瘍関連構造体は、腫瘍関連抗原と称される。

【０００５】

腫瘍関連抗原の特異的認識は、２つの機能的に相互連結された単位である細胞機構及び体液機構を含む：ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔリンパ球は、それぞれＭＨＣ（主要組織適合複合体）クラスＩＩ及びＩの分子上に提示されるプロセシングされた抗原を認識し、一方Ｂリンパ球は、未処理抗原に直接結合する循環抗体分子を産生する。腫瘍関連抗原の潜在的な臨床－治療上の重要性は、免疫系による腫瘍性細胞上の抗原の認識が細胞傷害性エフェクター機構の起動を導き、ヘルパーＴ細胞の存在下で、癌細胞の除去をもたらすことができるという事実から生じる（Ｐａｒｄｏｌｌ，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．４：５２５－３１，１９９８）。

【０００６】

抗体に基づく癌治療は、臨床の場に導入されて成功を収めており、この１０年間にわたって腫瘍学における最も有望な治療法として浮上してきた。８つの抗体が腫瘍性疾患の治療に関して承認されているが、それらの大部分は、しかしながら、リンパ腫及び白血病における治療である（Ａｄａｍｓ　ＧＰ，Ｗｅｉｎｅｒ　ＬＭ，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２３：１１４７－５７，２００５）。

【０００７】

次世代の改良された抗体ベースの癌治療の出現のために克服すべき課題の１つは、良好な毒性／効果プロフィールにとっての鍵となる、適切な標的分子の選択である。

【０００８】

健常組織の大部分では堅く沈黙している遺伝子についての検索は、配偶子形成及び／又は栄養膜系譜の遺伝子がしばしば異所性に活性化され、ヒト癌において堅固に発現されるという興味深い所見に関心の焦点を移している。生殖細胞、妊娠性栄養膜細胞及び癌細胞の間の表現型類似性に基づき、Ｊｏｈｎ　Ｂｅａｒｄは、１００年も前に、「癌の栄養膜理論（ｔｒｏｐｈｏｂｌａｓｔｉｃ　ｔｈｅｏｒｙ　ｏｆ　ｃａｎｃｅｒ）」（Ｂｅａｒｄ　Ｊ，Ｌａｎｃｅｔ　１：１７５８－６３，１９０２；Ｇｕｒｃｈｏｔ　Ｃ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３１：３１０－３，１９７５）を提案した。癌細胞による絨毛性性腺刺激ホルモン、α－フェトプロテイン、ＣＥＡ及び他の栄養膜ホルモンの散発性産生の発見は、新生細胞と栄養膜細胞の間で共有される最初の分子を提供した（Ａｃｅｖｅｄｏ　ＨＦ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　７６：１４６７－７５，１９９５；Ｄｉｒｎｈｏｆｅｒ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｐａｔｈｏｌ　２９：３７７－８２，１９９８；Ｇｕｒｃｈｏｔ　Ｃ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３１：３１０－３，１９７５；Ｉｌｅｓ　ＲＫ，Ｃｈａｒｄ　Ｔ，Ｊ　Ｕｒｏｌ　１４５：４５３－８，１９９１；Ｌａｕｒｅｎｃｅ　ＤＪ，Ｎｅｖｉｌｌｅ　ＡＭ，Ｂｒ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　２６：３３５－５５，１９７２）。この概念は、着実に増殖する、いわゆる癌／生殖系（ＣＧ）クラスの遺伝子の確立（ｉｎａｕｇｕｒａｔｉｏｎ）によって再燃した。このようなクラスは、各々が様々な腫瘍型で発現される１００を超える構成要素で表されている。栄養膜及び配偶子形成のプログラム全体が転写サイレンシングを免れ、癌細胞において異所性に活性化されるという所見は（Ｋｏｓｌｏｗｓｋｉ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６４：５９８８－９３，２００４；Ｓｉｍｐｓｏｎ　ＡＪ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｃａｎｃｅｒ　５：６１５－２５，２００５）、極めて選択的な組織分布を有するこのクラスの遺伝子内で、ｍＡＢ療法のための適切な標的を見出し得ることを示す。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｐａｒｄｏｌｌ，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．４：５２５－３１，１９９８

【非特許文献２】Ａｄａｍｓ　ＧＰ，Ｗｅｉｎｅｒ　ＬＭ，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２３：１１４７－５７，２００５

【非特許文献３】Ｂｅａｒｄ　Ｊ，Ｌａｎｃｅｔ　１：１７５８－６３，１９０２；Ｇｕ

ｒｃｈｏｔ　Ｃ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３１：３１０－３，１９７５
【非特許文献４】Ａｃｅｖｅｄｏ　ＨＦ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　７６：１４６７－７５，１９９５
【非特許文献５】Ｄｉｒｎｈｏｆｅｒ　Ｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｐａｔｈｏｌ　２９：３７７－８２，１９９８
【非特許文献６】Ｇｕｒｃｈｏｔ　Ｃ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３１：３１０－３，１９７５
【非特許文献７】Ｉｌｅｓ　ＲＫ，Ｃｈａｒｄ　Ｔ，Ｊ　Ｕｒｏｌ　１４５：４５３－８，１９９１
【非特許文献８】Ｌａｕｒｅｎｃｅ　ＤＪ，Ｎｅｖｉｌｌｅ　ＡＭ，Ｂｒ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　２６：３３５－５５，１９７２
【非特許文献９】Ｋｏｓｌｏｗｓｋｉ　Ｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　６４：５９８８－９３，２００４
【非特許文献１０】Ｓｉｍｐｓｏｎ　ＡＪ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｃａｎｃｅｒ　５：６１５－２５，２００５

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
癌の診断及び治療のための標的構造体を提供することが本発明の目的であった。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
この目的は、特許請求の範囲に記載の要件によって達成される。
【００１２】
本発明によれば、腫瘍細胞において選択的に又は異常に発現されており、それ故、治療的及び診断的アプローチのための標的構造体を提供する、胎盤特異的遺伝子が同定される。
【００１３】
本発明により腫瘍細胞において選択的に又は異常に発現されると同定される核酸は、（ａ）配列表の配列番号１～５４０、５４１、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の核酸とハイブリダイズする核酸、（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の核酸に関して縮重している核酸、並びに（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の核酸に相補的である核酸、から成る群より選択される。これらの核酸はまた、本明細書では「腫瘍関連核酸」とも称される。
【００１４】
もう１つの態様では、本発明は、本発明により同定される腫瘍関連核酸によってコードされる抗原に関する。従って、本発明により同定される腫瘍関連抗原は、（ａ）配列表の配列番号１～５４０、５４１、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の核酸とハイブリダイズする核酸、（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の核酸に関して縮重している核酸、並びに（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の核酸に相補的である核酸、から成る群より選択される核酸によってコードされるアミノ酸配列を有する。好ましい実施形態では、本発明により同定される腫瘍関連抗原は、配列表の配列番号５４２、５４６、５５０、５５４、５６７、５７１、５８４、５８８、５９２、５９６、６０３、６０７、６１４、６２１及び６２５から成る群より選択されるアミノ酸配列、その一部又は誘導体を含む。
【００１５】
本発明により、特定核酸配列を含む核酸又は特定アミノ酸配列を含む腫瘍関連抗原に言及する場合、これはまた、核酸又は腫瘍関連抗原が、それぞれこれらの特定核酸配列又は

アミノ酸配列から成る実施形態も包含する。

【００１６】

本発明は、一般に、腫瘍性疾患の治療、予防、診断及び／又は観測のための、本発明により同定される腫瘍関連核酸及び腫瘍関連抗原又はその一部若しくは誘導体、又は腫瘍関連核酸に対する核酸、本発明により同定される腫瘍関連抗原に対する抗体若しくはＴ細胞又はその一部若しくは誘導体、及び／又は本発明により同定される腫瘍関連抗原を発現する宿主細胞又はその一部若しくは誘導体の使用に関する。

【００１７】

これはまた、これらの核酸、抗原、抗体、Ｔ細胞及び／又は宿主細胞の２又はそれ以上の組合せの使用を含み得る。

【００１８】

本発明により同定される腫瘍関連抗原に対する抗体又はその一部若しくは誘導体の使用に関する本発明の実施形態では、本発明により同定される腫瘍関連抗原に対するＴ細胞受容体又はその一部若しくは誘導体も、場合によりＭＨＣ分子との複合体として、使用し得る。

【００１９】

腫瘍関連抗原の非膜貫通部分、特に細胞外部分に対応する又はそれから構成される、本発明により同定される腫瘍関連抗原の一部は、治療、予防、診断及び／又は観測のために特に適切である。それ故、本発明によれば、腫瘍関連抗原の非膜貫通部分、特に細胞外部分に対応する又はそれから構成される、本発明により同定される腫瘍関連抗原の一部、又は本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸の対応する部分は、治療、予防、診断及び／又は観測のために好ましい。同様に、腫瘍関連抗原の非膜貫通部分、特に細胞外部分に対応する又はそれから構成される、本発明により同定される腫瘍関連抗原の一部に対する抗体の使用は好ましい。

【００２０】

治療、予防、診断及び／又は観測のための好ましい疾患は、本発明により同定される腫瘍関連核酸の１又はそれ以上が選択的に発現される又は異常発現される疾患である。治療、予防、診断及び／又は観測のための特に好ましい疾患は、本発明により同定される腫瘍関連核酸の１若しくはそれ以上及び／又はそれによってコードされる腫瘍関連抗原の１若しくはそれ以上が選択的に発現される又は異常発現される疾患である。

【００２１】

１つの態様では、本発明は、本発明により同定される腫瘍関連抗原又は腫瘍関連抗原をコードする核酸を認識し、好ましくは本発明により同定される腫瘍関連抗原の発現又は異常発現を有する細胞に選択的である薬剤を含有する医薬組成物に関する。

【００２２】

さらなる態様では、本発明は、（Ｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原の発現若しくは活性を阻害する、及び／又は（ＩＩ）腫瘍阻害活性若しくは腫瘍破壊活性を有し、本発明により同定される腫瘍関連抗原を発現する若しくは異常発現する細胞に選択的である、及び／又は（ＩＩＩ）投与したとき、ＭＨＣ分子と、本発明により同定される腫瘍関連抗原若しくは、ペプチドエピトープのような、その一部との間の複合体の量を選択的に増加させる薬剤を含有する医薬組成物に関する。

【００２３】

特定実施形態では、上記の薬剤は、細胞死の誘導、細胞増殖の低減、細胞膜への損傷又はサイトカインの分泌を生じさせることができ、好ましくは腫瘍阻害活性を有し得る。

【００２４】

１つの実施形態では、薬剤は、腫瘍関連抗原をコードする核酸と選択的にハイブリダイズするアンチセンス核酸である。さらなる実施形態では、薬剤は、好ましくはセンスＲＮＡ鎖とアンチセンスＲＮＡ鎖を含むｓｉＲＮＡであり、該ｓｉＲＮＡにおいて、センスＲＮＡ鎖とアンチセンスＲＮＡ鎖はＲＮＡ二本鎖を形成し、センスＲＮＡ鎖は、腫瘍関連抗原をコードする核酸、好ましくは腫瘍関連抗原をコードするｍＲＮＡ内の約１９～約２５

個の連続するヌクレオチドの標的配列に実質的に同一なヌクレオチド配列を含む。さらなる実施形態では、薬剤は、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体、特に腫瘍関連抗原に選択的に結合する補体活性化抗体又は毒素結合抗体である。好ましい実施形態では、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体は、治療上有用な物質に連結されている及び／又は天然又は人為的エフェクター機構を、腫瘍関連抗原を発現する又は異常発現する上記の細胞にリクルートする。さらなる実施形態では、薬剤は、細胞上のＭＨＣ分子に結合された腫瘍関連抗原又はその一部を認識し、このように標識された細胞を溶解する、細胞傷害性Ｔリンパ球である。さらなる実施形態では、薬剤は、細胞上のＭＨＣ分子に結合された腫瘍関連抗原又はその一部を認識し、該腫瘍関連抗原又はその一部を特異的に認識する他の細胞のエフェクター機能を増強する、Ｔヘルパーリンパ球である。

【００２５】

さらなる実施形態では、薬剤は、各々異なる腫瘍関連抗原若しくは腫瘍関連抗原をコードする異なる核酸を認識する、及び／又は異なる腫瘍関連抗原の発現若しくは活性を阻害する、及び／又は異なる腫瘍関連抗原を発現する若しくは異常発現する細胞に選択的な腫瘍阻害活性若しくは腫瘍破壊活性を有する、及び／又は投与したとき、ＭＨＣ分子と種々の異なる腫瘍関連抗原若しくはその一部との間の複合体の量を選択的に増加させる、２又はそれ以上の薬剤を含み、上記の異なる腫瘍関連抗原の少なくとも１つは本発明により同定される腫瘍関連抗原である。

【００２６】

好ましくは、選択的に腫瘍に限定される腫瘍関連抗原は、エフェクター機構をこの特定位置にリクルートするための標識として役立つ。この態様では、本発明は、薬剤自体は腫瘍関連抗原の活性又は腫瘍阻害活性若しくは腫瘍破壊活性を阻害する能力を有さないが、特にエフェクター機構、中でも細胞損傷潜在能を有する機構を特定位置、特に腫瘍又は腫瘍細胞にリクルートすることによってそのような作用を媒介する実施形態を包含する。

【００２７】

好ましくは、本発明により同定される腫瘍関連抗原を発現する又は異常発現する上記細胞は、非胎盤細胞である。

【００２８】

本発明により同定される腫瘍関連抗原の活性は、タンパク質又はペプチドの任意の活性であり得る。１つの実施形態では、この活性は酵素活性である。

【００２９】

本発明によれば、「発現又は活性を阻害する」という語句は、発現又は活性の完全な阻害又は基本的に完全な阻害及び発現又は活性の低減を包含する。

【００３０】

投与したとき、ＭＨＣ分子と本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部との間の複合体の量を選択的に増加させる薬剤は、（ｉ）腫瘍関連抗原又はその一部、（ｉｉ）上記腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸、（ｉｉｉ）上記腫瘍関連抗原又はその一部を発現する宿主細胞、及び（ｖｉ）上記腫瘍関連抗原からのペプチドエピトープとＭＨＣ分子との間の単離複合体、から成る群より選択される１又はそれ以上の成分を含む。

【００３１】

本発明はさらに、（ｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部、（ｉｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸、（ｉｉｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部に結合する抗体、（ｉｖ）本発明により同定される腫瘍関連核酸／本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸と特異的にハイブリダイズするアンチセンス核酸、（ｖ）本発明により同定される腫瘍関連核酸／本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸に対するｓｉＲＮＡ、（ｖｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部を発現する宿主細胞、及び（ｖｉｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部とＭＨＣ分子との間の単離複合体、から成る群より選択される１又はそれ以上の成分を含有する医薬組成物に関する。

【００３２】

１つの実施形態では、本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸は、発現ベクター内で及びプロモーターに機能的に連結されて、医薬組成物中に存在する。さらなる実施形態では、本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸は、以下でさらに述べるようにウイルス内で医薬組成物中に存在する。

【００３３】

本発明の医薬組成物中に存在する宿主細胞は、腫瘍関連抗原又はその一部を分泌して、それを表面上で発現することができ、好ましくは上記腫瘍関連抗原又はその一部に結合するＭＨＣ分子を付加的に発現し得る。１つの実施形態では、宿主細胞は、ＭＨＣ分子を内因的に発現する。さらなる実施形態では、宿主細胞は、ＭＨＣ分子及び／又は腫瘍関連抗原若しくはその一部を組換えによって発現する。宿主細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球又はマクロファージである。

【００３４】

さらなる実施形態では、本発明の医薬組成物中に存在する抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、抗体は、キメラ若しくはヒト化抗体、抗体のフラグメント、又は合成抗体である。抗体は、本明細書では治療薬又は診断薬とも称する、治療上又は診断上有用な薬剤に連結され得る。

【００３５】

本発明の医薬組成物中に存在するアンチセンス核酸は、本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸の６～５０、特に１０～３０、１５～３０及び２０～３０個の連続するヌクレオチドの配列を含み得る。

【００３６】

さらなる実施形態では、直接に又は核酸の発現を介して本発明の医薬組成物によって提供される、腫瘍関連抗原又はその一部は、細胞の表面でＭＨＣ分子に結合し、上記結合は、好ましくは細胞溶解応答を生じさせる及び／又はサイトカイン放出を誘導する。

【００３７】

本発明の医薬組成物は、医薬的に適合性の担体及び／又はアジュバントを含有し得る。

【００３８】

本発明の医薬組成物は、好ましくは、腫瘍関連核酸及び／又は腫瘍関連抗原の選択的発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患の治療又は予防のために使用される。好ましい実施形態では、疾患は、腫瘍性疾患、好ましくは癌である。

【００３９】

好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は、治療的又は予防的に使用し得るワクチンの形態である。そのようなワクチンは、好ましくは本発明により同定される腫瘍関連抗原若しくはその一部、及び／又は本発明により同定される腫瘍関連抗原若しくはその一部をコードする核酸を含有する。特定実施形態では、核酸はウイルス又は宿主細胞内に存在する。

【００４０】

本発明はさらに、本発明により同定される１又はそれ以上の腫瘍関連核酸の発現又は異常発現によって特徴づけられ、好ましくは本発明により同定される１又はそれ以上の腫瘍関連抗原の発現又は異常発現も生じさせる疾患、好ましくは腫瘍性疾患、特に癌を治療する、予防する、診断する又は観測する、すなわち上記疾患の後退、進行、経過及び／又は発症を測定する方法に関する。１つの実施形態では、治療又は予防は、本発明の医薬組成物を投与することを含む。

【００４１】

本発明による診断の方法及び／又は観測の方法は、一般に、患者から、好ましくは上記疾患を有する、上記疾患を有する若しくは罹患することが疑われる又は上記疾患の潜在的可能性を有する患者から単離された生物学的試料における、（ｉ）本発明により同定される腫瘍関連核酸又はその一部、（ｉｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部、（ｉｉｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部に対する抗体、及び（

ｉｖ）本発明により同定される腫瘍関連抗原若しくはその一部に特異的なＴリンパ球、好ましくは細胞傷害性リンパ球若しくはＴヘルパーリンパ球及び／又は腫瘍関連抗原又はその一部とＭＨＣ分子との間の複合体、から成る群より選択される１又はそれ以上のパラメータの検出及び／又はその量の測定に関する。上記検出及び／又は量の測定を達成するための手段は、本明細書において説明され、当業者に明らかになる。

【００４２】

好ましくは、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球の存在、及び／又は上記疾患を有していない患者と比較して増大する、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球の量は、上記疾患の存在又は上記疾患の発現の潜在的可能性の指標である。

【００４３】

本発明の診断及び／又は観測の方法はまた、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球の検出又はその量の測定により、上記疾患の転移挙動を評価する及び／又は予後判定することが可能である実施形態を包含し、上記実施形態では、好ましくは、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球の存在、及び／又は上記疾患を有していない若しくは上記疾患の転移を有していない患者と比較して増大した、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球の量は、上記疾患の転移挙動又は上記疾患の転移挙動の潜在的可能性の指標である。

【００４４】

特定実施形態では、上記検出又は量の測定は、（ｉ）生物学的試料を、上記腫瘍関連核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体又は上記Ｔリンパ球に特異的に結合する薬剤と接触させること、及び（ｉｉ）薬剤と、核酸若しくはその一部、腫瘍関連抗原若しくはその一部、抗体、又はＴリンパ球との間の複合体の形成を検出すること又は複合体の量を測定することを含む。

【００４５】

１つの実施形態では、疾患は、２又はそれ以上の異なる腫瘍関連核酸の発現又は異常発現によって特徴づけられ、好ましくは２又はそれ以上の異なる腫瘍関連抗原の発現又は異常発現も生じさせ、検出又は量の測定は、２又はそれ以上の異なる腫瘍関連核酸若しくはその一部、２又はそれ以上の異なる腫瘍関連抗原若しくはその一部、上記２又はそれ以上の異なる腫瘍関連抗原若しくはその一部に結合する２又はそれ以上の抗体、及び／又は上記２又はそれ以上の異なる腫瘍関連抗原若しくはその一部、若しくはＭＨＣ分子とのその複合体に特異的な、２又はそれ以上のＴリンパ球の検出又はその量の測定を含む。さらなる実施形態では、患者から単離された生物学的試料を、対応する正常な生物学的試料と比較する。

【００４６】

本発明による観測の方法は、好ましくは、第１時点で第１試料において及び第２時点でさらなる試料において、前述したパラメータの１又はそれ以上を検出する及び／又はその量を測定することを含み、２つの試料を比較することによって疾患の経過を判定する。

【００４７】

好ましくは、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球のレベルが、患者から以前に採取した試料と比較して試料中で増大したことは、患者が癌及び／又は癌の転移及び／又は癌の再発を発現した又は発現しかかっていることを示す。好ましくは、上記核酸若しくは上記その一部、上記腫瘍関連抗原若しくは上記その一部、上記抗体及び／又は上記Ｔリンパ球のレベルが、患者から以前に採取した試料と比較して試料中で低下していることは、上記患者における癌及び／又は癌の転移の後退を示し、それ故、好ましくは癌治療の成功を示す。

【００４８】

本発明によれば、核酸若しくはその一部の検出又は核酸若しくはその一部の量の測定は、上記核酸若しくは上記その一部に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドプローブを使用して実施し得るか、又は上記核酸若しくは上記その一部の選択的増幅によって、例えばＰＣＲ増幅を用いて実施し得る。１つの実施形態では、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドプローブは、上記核酸の６～５０、特に１０～３０、１５～３０及び２０～３０個の連続するヌクレオチドの配列を含む。

【００４９】

特定実施形態では、本発明の方法において検出される腫瘍関連抗原若しくはその一部又は測定される量は、細胞内、細胞表面上又はＭＨＣ分子との複合体中に存在する。

【００５０】

本発明によれば、腫瘍関連抗原若しくはその一部の検出又は腫瘍関連抗原若しくはその一部の量の測定は、上記腫瘍関連抗原又は上記その一部に特異的に結合する抗体を使用して実施し得る。

【００５１】

本発明によれば、抗体の検出又は抗体の量の測定は、上記抗体に特異的に結合するタンパク質又はペプチドを使用して実施し得る。

【００５２】

本発明によれば、腫瘍関連抗原若しくはその一部に特異的なＴリンパ球及び／又はＭＨＣ分子とのその複合体の検出又はその量の測定は、上記腫瘍関連抗原又は上記その一部とＭＨＣ分子との間の複合体を提示する細胞を使用して実施し得る。Ｔリンパ球は、それらの増殖、それらのサイトカイン産生、及びＭＨＣ分子と腫瘍関連抗原又はその一部との複合体による特異的刺激によって引き金が引かれるそれらの細胞傷害活性を検出することによって付加的に検出し得る。Ｔリンパ球はまた、組換えＭＨＣ分子又は１若しくはそれ以上の腫瘍関連抗原の免疫原性フラグメントが負荷された２若しくはそれ以上のＭＨＣ分子の複合体を用いて検出し得る。

【００５３】

オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドプローブ、抗体、タンパク質又はペプチド又は細胞のような、本発明の方法における検出又は量の測定のために使用される薬剤は、好ましくは検出可能に、特に放射性マーカー又は酵素マーカーのような検出可能なマーカーによって標識される。

【００５４】

特定態様では、本発明は、本発明により同定される腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患を治療する、予防する、診断する又は観測する方法であって、上記腫瘍関連抗原又はその一部に結合し、且つ治療薬又は診断薬に連結されている抗体を投与することを含む方法に関する。抗体はモノクローナル抗体であり得る。さらなる実施形態では、抗体は、キメラ抗体若しくはヒト化抗体又は抗体のフラグメントである。

【００５５】

ある実施形態では、疾患を診断する又は観測する本発明の方法は、播種性腫瘍細胞又は転移性腫瘍細胞を含む又は含むことが疑われる生物学的試料を用いて実施される。

【００５６】

そのような生物学的試料は、例えば血液、血清、骨髄、痰、気管支吸引液、及び／又は気管支洗浄液を含む。好ましくは、疾患を診断する又は観測する本発明の方法は、胎盤細胞を含まない、特に、被験者から単離された非胎盤生物学的試料である生物学的試料を用いて実施される。

【００５７】

１つの特定態様では、本発明は、本発明により同定される腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患を有する患者を治療する方法であって、（ｉ）上記患者から又は同じ種の別の個体、特に健常個体又は異なる種の個体から得た、免疫反応性細胞を含む試料を提供すること、（ｉｉ）上記試料を、上記腫瘍関連抗原又はその一部に対する細胞溶解性Ｔ細胞の産生を促進する条件下で、上記腫瘍関連抗原又はその一部を発現す

る宿主細胞と接触させること、及び（ｉｉｉ）細胞溶解性Ｔ細胞を、腫瘍関連抗原又はその一部を発現する細胞を溶解するために適切な量で患者に導入することを含む方法に関する。１つの実施形態では、その方法は、得られた細胞溶解性Ｔ細胞のＴ細胞受容体をクローニングすること、Ｔ細胞受容体をコードする核酸を、上記患者から又は同じ種の別の個体、特に健常個体又は異なる種の個体から得た、Ｔ細胞に移入することを含み、このようにして上記Ｔ細胞は所望の特異性を受容し、（ｉｉｉ）におけるように、患者に導入され得る。

【００５８】

１つの実施形態では、宿主細胞は、ＭＨＣ分子を内因的に発現する。さらなる実施形態では、宿主細胞は、ＭＨＣ分子及び／又は腫瘍関連抗原若しくはその一部を組換え発現する。好ましくは、宿主細胞は、ＭＨＣ分子によって腫瘍関連抗原又はその一部をその表面に提示する。宿主細胞は、好ましくは非増殖性である。好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球又はマクロファージである。

【００５９】

本発明はまた、本発明により同定される腫瘍関連抗原の発現又は異常発現によって特徴づけられる疾患を治療する方法であって、（ｉ）異常量の腫瘍関連抗原を発現する、患者からの細胞を同定すること、（ｉｉ）上記細胞の試料を単離すること、（ｉｉｉ）上記細胞を培養すること、及び（ｉｖ）上記細胞を、細胞に対する免疫応答の引き金を引くために適切な量で患者に導入することを含む方法に関する。

【００６０】

本発明はさらに、（ａ）配列番号１～５４０、５４１、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の核酸とハイブリダイズする核酸、（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の核酸に関して縮重している核酸、並びに（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の核酸に相補的である核酸、から成る群より選択される核酸に関する。

【００６１】

さらなる態様では、本発明は、本発明の核酸を含む組換え核酸分子、特にＤＮＡ又はＲＮＡ分子に関する。

【００６２】

本発明はまた、本発明の核酸又は組換え核酸分子を含む宿主細胞に関する。

【００６３】

宿主細胞はまた、ＭＨＣ分子をコードする核酸を含み得る。１つの実施形態では、宿主細胞は、ＭＨＣ分子を内因的に発現する。さらなる実施形態では、宿主細胞は、ＭＨＣ分子及び／又は本発明の核酸若しくは組換え核酸分子若しくはその一部を組換え発現する。好ましくは、宿主細胞は非増殖性である。好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球又はマクロファージである。

【００６４】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明により同定される核酸とハイブリダイズし、遺伝子プローブとして又は「アンチセンス」分子として使用し得るオリゴヌクレオチドに関する。本発明により同定される核酸又はその一部とハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマー又はコンピテントプローブの形態の核酸分子は、例えばＰＣＲ増幅、サザン及びノーザンハイブリダイゼーションによって、上記核酸を検出するため及び／又は本発明により同定される上記核酸に相同な核酸を見出すために使用し得る。ハイブリダイゼーションは、低ストリンジェンシー下で、より好ましくは中ストリンジェンシー下で、最も好ましくは高ストリンジェンシー下で実施し得る。

【００６５】

さらなる態様では、本発明は、（ａ）配列番号１～５４０、５４１、５４５、５４９、５５３、５５７、５６０、５６３、５６６、５７０、５７４、５７７、５８０、５８３、

５８７、５９１、５９５、５９９、６０２、６０６、６１０、６１３、６１７、６２０及び６２４から成る群より選択される核酸配列、その一部又は誘導体を含む核酸、（ｂ）ストリンジェント条件下で（ａ）の核酸とハイブリダイズする核酸、（ｃ）（ａ）又は（ｂ）の核酸に関して縮重している核酸、並びに（ｄ）（ａ）、（ｂ）又は（ｃ）の核酸に相補的である核酸、から成る群より選択される核酸によってコードされるタンパク質又はペプチドに関する。好ましい実施形態では、上記タンパク質又はペプチドは、配列表の配列番号５４２、５４６、５５０、５５４、５６７、５７１、５８４、５８８、５９２、５９６、６０３、６０７、６１４、６２１及び６２５から成る群より選択されるアミノ酸配列、その一部又は誘導体を含む。

【００６６】

さらなる態様では、本発明は、本発明により同定される腫瘍関連抗原の免疫原性フラグメントに関する。上記フラグメントは、好ましくはＭＨＣ分子又は抗体、好ましくはヒトＨＬＡ受容体又はヒト抗体に結合する。本発明によれば、部分又はフラグメントは、好ましくは少なくとも５、少なくとも６、特に少なくとも８、少なくとも１０、少なくとも１２、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも３０又は少なくとも５０個のアミノ酸の配列を含む。

【００６７】

さらなる態様では、本発明は、本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部に結合する薬剤に関する。好ましい実施形態では、薬剤は、タンパク質又はペプチド、特に抗体、Ｔ細胞受容体又はＭＨＣ分子である。さらなる実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体、組み合わせ手法によって作製される抗体、又は抗体のフラグメントである。１つの好ましい実施形態では、本発明は、（ｉ）本発明により同定される腫瘍関連抗原又はその一部と（ｉｉ）本発明により同定される上記腫瘍関連抗原又は上記その一部が結合しているＭＨＣ分子との複合体に選択的に結合し、（ｉ）又は（ｉｉ）に単独には結合しない抗体に関する。

【００６８】

本発明によれば、「結合」という用語は、好ましくは特異的結合に関する。「特異的結合］は、抗体のような薬剤が、それが特異的であるエピトープのような標的に対して、別の標的への結合と比較してより強く結合することを意味する。ある薬剤がある解離定数（K_D）で第１標的に結合し、その解離定数が第２標的に対する解離定数よりも低い場合、薬剤は第２標的に比べて第１標的により強く結合する。好ましくは、薬剤が特異的に結合する標的についての解離定数（K_D）は、薬剤が特異的に結合しない標的についての解離定数（K_D）よりも１０倍を超えて、好ましくは２０倍を超えて、より好ましくは５０倍を超えて、さらに一層好ましくは１００倍、２００倍、５００倍又は１０００倍を超えて低い。

【００６９】

そのような特異的抗体は、例えば上記ペプチドを使用した免疫法によって入手し得る。

【００７０】

本発明はさらに、本発明により同定される腫瘍関連抗原若しくはその一部又は本発明の抗体に結合する本発明の薬剤と、治療薬又は診断薬との間のコンジュゲートに関する。１つの実施形態では、治療薬又は診断薬は毒素である。

【００７１】

さらなる態様では、本発明は、本発明により同定される１又はそれ以上の腫瘍関連核酸の発現又は異常発現によって特徴づけられ、好ましくは本発明により同定される１又はそれ以上の腫瘍関連抗原の発現又は異常発現も生じさせる疾患、好ましくは腫瘍性疾患、特に癌を検出するためのキットであって、（ｉ）腫瘍関連核酸若しくはその一部、（ｉｉ）腫瘍関連抗原若しくはその一部、（ｉｉｉ）腫瘍関連抗原若しくはその一部に結合する抗体、及び／又は（ｉｖ）腫瘍関連抗原若しくはその一部に特異的なＴ細胞又はＭＨＣ分子とのその複合体の検出又はその量の測定のための薬剤を含むキットに関する。そのような薬剤は本明細書において上記で説明されている。

【図面の簡単な説明】
【００７２】
【図１】正常組織及び癌組織における本発明により同定される腫瘍関連核酸の発現。　配列番号５４０の核酸配列の有意の発現は、胎盤組織及び乳癌においてのみ認められた。
【図２】正常組織及び癌組織における本発明により同定される腫瘍関連核酸の定量的発現。　定量的ＲＴ－ＰＣＲは、胎盤組織及び乳癌において配列番号５４０の核酸配列の選択的発現を示した。
【図３】ＭＣＦ－７乳癌細胞における配列番号５４０のｍＲＮＡの定量的発現。　ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドによるトランスフェクションの２４時間後のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、２つの配列番号５４０特異的ｓｉＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ　Ｎｏ．１（配列番号６３０、６３１）、ｓｉＲＮＡ　Ｎｏ．２（配列番号６３２、６３３））が配列番号５４０発現の強固なサイレンシングを誘導することを示した。
【図４】ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドでのトランスフェクションによる配列番号５４０発現のサイレンシングは、ＭＣＦ－７乳癌細胞の増殖障害を生じさせる。　ｓｉＲＮＡによるトランスフェクションの９６時間後に、新たに合成されたＤＮＡ鎖へのＢｒｄＵの組込みを測定することによって増殖を定量した。これらの結果は、配列番号５４０が乳癌細胞の増殖のための正の因子であることを示す。
【図５】正常組織及び癌組織における配列番号５４１の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、肺癌における配列番号５４１の核酸配列の過剰発現を示した。
【図６】正常組織及び癌組織における配列番号５４５の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、悪性黒色腫における配列番号５４５の核酸配列の過剰発現を示した。
【図７】正常組織及び癌組織における配列番号５４９の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、卵巣癌における配列番号５４９の核酸配列の過剰発現を示した。
【図８】正常組織及び癌組織における配列番号５５３の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、結腸癌及び卵巣癌における配列番号５５３の核酸配列の過剰発現を示した。
【図９】正常組織及び癌組織における配列番号５５７の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、乳癌における配列番号５５７の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１０】正常組織及び癌組織における配列番号５６０の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、結腸癌及び卵巣癌における配列番号５６０の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１１】正常組織及び癌組織における配列番号５６３の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、乳癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫における配列番号５６３の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１２】正常組織及び癌組織における配列番号５６６の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌、乳癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫における配列番号５６６の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１３】正常組織及び癌組織における配列番号５７０の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、卵巣癌、肺癌及び黒色腫における配列番号５７０の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１４】正常組織及び癌組織における配列番号５７４の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、肺癌及び黒色腫における配列番号５７４の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１５】正常組織及び癌組織における配列番号５７７の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌、乳癌及び肺癌における配列番号５７７の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１６】正常組織及び癌組織における配列番号５８０の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、卵巣癌及び肺癌における配列番号５８０の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１７】正常組織及び癌組織における配列番号５８３の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、結腸癌、卵巣癌及び肺癌における配列番号５８３の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１８】正常組織及び癌組織における配列番号５８７の定量的発現。　リアルタイムＲ

Ｔ－ＰＣＲは、肺癌における配列番号５８７の核酸配列の過剰発現を示した。
【図１９】正常組織及び癌組織における配列番号５９１の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、乳癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫における配列番号５９１の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２０】正常組織及び癌組織における配列番号５９５の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫における配列番号５９５の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２１】正常組織及び癌組織における配列番号５９９の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌、乳癌、肺癌及び黒色腫における配列番号５９９の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２２】正常組織及び癌組織における配列番号６０２の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、卵巣癌及び肺癌における配列番号６０２の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２３】正常組織及び癌組織における配列番号６０６の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌、結腸癌及び肺癌における配列番号６０６の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２４】正常組織及び癌組織における配列番号６１０の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌、乳癌及び肺癌における配列番号６１０の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２５】正常組織及び癌組織における配列番号６１３の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、乳癌、肺癌及び黒色腫における配列番号６１３の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２６】正常組織及び癌組織における配列番号６１７の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、肺癌及び黒色腫における配列番号６１７の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２７】正常組織及び癌組織における配列番号６２０の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、卵巣癌及び黒色腫における配列番号６２０の核酸配列の過剰発現を示した。
【図２８】正常組織及び癌組織における配列番号６２４の定量的発現。　リアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、胃癌及び肺癌における配列番号６２４の核酸配列の過剰発現を示した。
【発明を実施するための形態】
【００７３】
本明細書における数値の範囲への言及は、上記範囲に含まれる個々の数値の各々を指定し、言及すると理解されるべきである。例えば、配列番号１～５４０への言及は、以下の個々の配列番号：１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５３、１５４、１５５、１５６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、１８１、１８２、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、１９０、１９１、１９２、１９３、１９４、１９５、１９６、１９７、１９８、１９９、２００、２０１、２０２、２０３、２０４、２０５、

２０６、２０７、２０８、２０９、２１０、２１１、２１２、２１３、２１４、２１５、
２１６、２１７、２１８、２１９、２２０、２２１、２２２、２２３、２２４、２２５、
２２６、２２７、２２８、２２９、２３０、２３１、２３２、２３３、２３４、２３５、
２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４２、２４３、２４４、２４５、
２４６、２４７、２４８、２４９、２５０、２５１、２５２、２５３、２５４、２５５、
２５６、２５７、２５８、２５９、２６０、２６１、２６２、２６３、２６４、２６５、
２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、
２７６、２７７、２７８、２７９、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、
２８６、２８７、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、
２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、３０３、３０４、３０５、
３０６、３０７、３０８、３０９、３１０、３１１、３１２、３１３、３１４、３１５、
３１６、３１７、３１８、３１９、３２０、３２１、３２２、３２３、３２４、３２５、
３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３５、
３３６、３３７、３３８、３３９、３４０、３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、
３４６、３４７、３４８、３４９、３５０、３５１、３５２、３５３、３５４、３５５、
３５６、３５７、３５８、３５９、３６０、３６１、３６２、３６３、３６４、３６５、
３６６、３６７、３６８、３６９、３７０、３７１、３７２、３７３、３７４、３７５、
３７６、３７７、３７８、３７９、３８０、３８１、３８２、３８３、３８４、３８５、
３８６、３８７、３８８、３８９、３９０、３９１、３９２、３９３、３９４、３９５、
３９６、３９７、３９８、３９９、４００、４０１、４０２、４０３、４０４、４０５、
４０６、４０７、４０８、４０９、４１０、４１１、４１２、４１３、４１４、４１５、
４１６、４１７、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２３、４２４、４２５、
４２６、４２７、４２８、４２９、４３０、４３１、４３２、４３３、４３４、４３５、
４３６、４３７、４３８、４３９、４４０、４４１、４４２、４４３、４４４、４４５、
４４６、４４７、４４８、４４９、４５０、４５１、４５２、４５３、４５４、４５５、
４５６、４５７、４５８、４５９、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、
４６６、４６７、４６８、４６９、４７０、４７１、４７２、４７３、４７４、４７５、
４７６、４７７、４７８、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４、４８５、
４８６、４８７、４８８、４８９、４９０、４９１、４９２、４９３、４９４、４９５、
４９６、４９７、４９８、４９９、５００、５０１、５０２、５０３、５０４、５０５、
５０６、５０７、５０８、５０９、５１０、５１１、５１２、５１３、５１４、５１５、
５１６、５１７、５１８、５１９、５２０、５２１、５２２、５２３、５２４、５２５、
５２６、５２７、５２８、５２９、５３０、５３１、５３２、５３３、５３４、５３５、
５３６、５３７、５３８、５３９、及び５４０の１つ１つに言及すると理解されるべきである。

【００７４】

本発明によれば、参照試料又は参照生物のような「参照品」は、本発明の方法において試験試料又は試験生物、すなわち患者から得た結果を相互に関連付け、比較するために使用し得る。典型的には、参照生物は健常生物、特に癌に罹患していない生物である。

【００７５】

「参照値」は、十分に大きな数の参照品を測定することによって参照品から経験的に決定することができる。好ましくは、参照値は、少なくとも２、好ましくは少なくとも３、好ましくは少なくとも５、好ましくは少なくとも８、好ましくは少なくとも１２、好ましくは少なくとも２０、好ましくは少なくとも３０、好ましくは少なくとも５０、又は好ましくは少なくとも１００の参照品を測定することによって決定される。

【００７６】

本発明によれば、核酸は、好ましくはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）又はリボ核酸（ＲＮＡ）である。核酸は、本発明によれば、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、組換え生産された分子及び化学合成された分子を包含する。本発明によれば、核酸は、一本鎖又は二本鎖として及び直鎖状分子又は共有結合閉環分子として存在し得る。

【００７７】
「本発明により同定される腫瘍関連核酸」及び「本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸」という用語は、同様の意味を有する。しかし、一部の実施形態では核酸、特にｍＲＮＡの発現だけが関連しており、タンパク質の発現は重要な因子ではないという事実を説明するために、異なる用語が本明細書で使用される。
【００７８】
本明細書で使用される、「ＲＮＡ」という用語は、少なくとも１個のリボヌクレオチド残基を含む分子を意味する。「リボヌクレオチド」とは、β－Ｄ－リボフラノース部分の２'位置にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを意味する。この用語は、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分精製ＲＮＡのような単離ＲＮＡ、基本的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え生産されたＲＮＡ、並びに１又はそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は改変により、天然に生じるＲＮＡとは異なる改変したＲＮＡを包含する。そのような改変は、ＲＮＡの末端又は内部などへの、例えばＲＮＡの１又はそれ以上のヌクレオチドにおける、非ヌクレオチド物質の付加を含み得る。ＲＮＡ分子内のヌクレオチドはまた、非天然に生じるヌクレオチド又は化学合成ヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドのような、非標準ヌクレオチドも含み得る。これらの改変したＲＮＡは、類似体又は天然に生じるＲＮＡの類似体と称され得る。
【００７９】
本明細書において核酸の検出又は核酸の量の測定に言及する場合、実際に検出されるべき核酸又はその量が実際に測定されるべきである核酸は、好ましくはｍＲＮＡである。しかし、これはまた、ｍＲＮＡが間接的に検出される又はｍＲＮＡの量が間接的に測定される実施形態を含み得ることが了解されるべきである。例えば、ｍＲＮＡがｃＤＮＡに形質転換されて、そのｃＤＮＡが検出されてもよい又はその量が測定されてもよい。本明細書に示されるｍＲＮＡはｃＤＮＡの等価物である。当業者は、ｃＤＮＡ配列がｍＲＮＡ配列と等価であり、本明細書において同じ目的に、例えば検出されるべき核酸にハイブリダイズするプローブの作製のために使用できることを理解する。故に、本明細書において配列表に示す配列に言及する場合、これは、上記配列のＲＮＡ等価物も包含する。
【００８０】
本発明において述べる核酸は、好ましくは単離されている。「単離核酸」という用語は、本発明によれば、核酸が、（ｉ）インビトロで、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって増幅された、（ｉｉ）クローニングによって組換え生産された、（ｉｉｉ）例えば切断とゲル電気泳動による分画によって精製された、又は（ｉｖ）例えば化学合成によって合成されたことを意味する。単離核酸は、組換えＤＮＡ手法による操作のために使用可能な核酸である。
【００８１】
本発明による縮重核酸は、遺伝暗号の縮重のためにコドン配列が参照核酸とは異なる核酸である。
【００８２】
核酸の「誘導体」は、本発明によれば、単一又は複数の、例えば少なくとも２、少なくとも４又は少なくとも６、及び好ましくは３まで、４まで、５まで、６まで、１０まで、１５まで又は２０までのヌクレオチド置換、欠失及び／又は付加が上記核酸内に存在することを意味する。さらに、「誘導体」という用語はまた、ヌクレオチド塩基、糖又はリン酸上の核酸の化学的誘導体化を包含する。「誘導体」という用語はまた、天然では生じないヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含む核酸を包含する。
【００８３】
好ましくは、本明細書で述べる特定核酸配列と、上記特定核酸配列の誘導体である、上記特定核酸配列とハイブリダイズする、及び／又は上記特定核酸配列に関して縮重している核酸配列との間の同一性の程度は、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらに一層好ましくは少なくとも９０％又は最も好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９

９％である。同一性の程度は、好ましくは少なくとも約３０、少なくとも約５０、少なくとも約７０、少なくとも約９０、少なくとも約１００、少なくとも約１５０、少なくとも約２００、少なくとも約２５０、少なくとも約３００、又は少なくとも約４００ヌクレオチドの領域に関して与えられる。好ましい実施形態では、同一性の程度は、配列表に記載されている核酸配列のような、参照核酸配列の全長に関して与えられる。

【００８４】

２つの配列が互いにハイブリダイズして、安定な二本鎖を形成することができる場合、核酸はもう１つの別の核酸に「相補的」であり、ハイブリダイゼーションは、好ましくはポリヌクレオチド間の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする条件（ストリンジェント条件）下で実施される。ストリンジェント条件は、例えばＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｅｄｉｔｏｒｓ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９又はＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｅｄｉｔｏｒｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋの中で記載されており、例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液（３．５×ＳＳＣ、０．０２％フィコール、０．０２％ポリビニルピロリドン、０．０２％ウシ血清アルブミン、２．５ｍＭ NaH_2PO_4（ｐＨ７）、０．５％ＳＤＳ、２ｍＭ ＥＤＴＡ）中６５℃でのハイブリダイゼーションを参照されたい。ＳＳＣは、０．１５Ｍ塩化ナトリウム／０．１５Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ７である。ハイブリダイゼーション後、ＤＮＡが導入された膜を、例えば室温にて２×ＳＳＣ中で、次に６８℃までの温度で０．１～０．５×ＳＳＣ／０．１×ＳＤＳ中で洗浄する。

【００８５】

相補性パーセントは、第２の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン－クリック型塩基対合）を形成することができる核酸分子内の連続する残基のパーセンテージを示す（例えば、１０個のうち５、６、７、８、９、１０個は、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％及び１００％相補的である）。「完全に相補的（ｐｅｒｆｅｃｔｌｙ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ、ｆｕｌｌｙ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ）」とは、核酸配列のすべての連続する残基が第２の核酸配列内の同数の連続する残基と水素結合することを意味する。好ましくは、本発明による相補性の程度は、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらに一層好ましくは少なくとも９０％又は最も好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％である。

【００８６】

「配列類似性」は、同一であるか又は保存的アミノ酸置換であるアミノ酸のパーセンテージを示す。２つのポリペプチド又は核酸配列の間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸又はヌクレオチドのパーセンテージを示す。

【００８７】

「同一性パーセンテージ」は、最良のアラインメント後に得られた、比較する２つの配列の間で同一であるヌクレオチド又はアミノ酸残基のパーセンテージを表すことが意図されており、このパーセンテージは純粋に統計的であって、２つの配列の間の相違は無作為に及びそれらの長さ全体にわたって分布する。２つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の配列比較は、従来、これらの配列を最適に整列した後に比較することによって実施され、上記比較は、配列類似性の局所領域を同定し、比較するために、セグメントによって又は「比較ウインドウ」によって実施される。比較のための配列の最適アラインメントは、手操作による以外に、Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｗａｔｅｒｍａｎ，１９８１，Ａｄｓ Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．２，４８２のローカルホモロジーアルゴリズムによって、Ｎｅｄｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４３のローカルホモロジーアルゴリズムによって、Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｌｉｐｍａｎ，１９８８，

Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５，２４４４の類似性検索法によって、又はこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．におけるＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ Ｐ、ＢＬＡＳＴ Ｎ及びＴＦＡＳＴＡ）によって作成され得る。

【００８８】

同一性パーセンテージは、比較する２つの配列の間の同一位置の数を決定し、これら２つの配列の間の同一性パーセンテージを得るために、この数を比較する位置の数で除して、得られた結果に１００を乗じることによって計算される。

【００８９】

１つの実施形態では、特定核酸配列の誘導体である、特定核酸配列に関して縮重している、又は特定核酸配列の一部である核酸配列は、特定核酸配列に関連する機能及び／又は活性を有する。すなわち、この核酸配列は、特定核酸配列によってコードされるタンパク質又はペプチドと同じ活性又は免疫学的性質を有するタンパク質又はペプチドをコードすることができ、１つの実施形態では、同じタンパク質又はペプチドをコードすることができる。

【００９０】

腫瘍関連抗原をコードする核酸は、本発明によれば、単独で又は他の核酸、特に異種核酸との組合せで存在し得る。好ましい実施形態では、核酸は、上記核酸に関して相同又は異種であり得る発現制御配列又は調節配列に機能的に連結されている。コード配列と調節配列は、それらが、上記コード配列の発現又は転写が上記調節配列の制御下又は影響下にあるように互いに共有結合で連結されている場合、互いに「機能的に」連結されている。コード配列が機能的タンパク質に翻訳される場合、調節配列が上記コード配列に機能的に連結されていれば、上記調節配列の誘導は、コード配列内にフレームシフトを引き起こすことなく又は上記コード配列が所望のタンパク質又はペプチドに翻訳されるのを不可能にすることなく、上記コード配列の転写を生じさせる。

【００９１】

「発現制御配列」又は「調節配列」という用語は、本発明によれば、プロモーター、エンハンサー及び遺伝子の発現を調節する他の制御エレメントを含む。本発明の特定実施形態では、発現制御配列を調節することができる。調節配列の正確な構造は種又は細胞型に応じて異なり得るが、一般には、ＴＡＴＡボックス、キャッピング配列、ＣＡＡＴ配列等のような、それぞれ転写及び翻訳の開始に関与する５'非転写配列及び５'非翻訳配列を含む。より詳細には、５'非転写調節配列は、機能的に連結された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含有するプロモーター領域を含む。調節配列はまた、エンハンサー配列又は上流活性化配列を含み得る。

【００９２】

本発明によれば、核酸はさらに、上記核酸によってコードされるタンパク質又はペプチドの宿主細胞からの分泌を制御するペプチドをコードする別の核酸との組合せで存在し得る。本発明によれば、核酸はまた、コードされるタンパク質又はペプチドが宿主細胞の細胞膜に固定される又は上記細胞の特定小器官に区分されることを生じさせるペプチドをコードする別の核酸との組合せで存在し得る。同様に、レポーター遺伝子又は何らかの「タグ」である核酸との組合せが可能である。

【００９３】

好ましい実施形態では、組換え核酸分子は、本発明によればベクターであり、プロモーターが適切であれば、ベクターは核酸、例えば本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸の発現を制御する。「ベクター」という用語は、本明細書ではその最も一般的な意味で使用され、核酸が、例えば原核細胞及び／又は真核細胞に導入されて、適切な場合には、ゲノムに組み込まれることを可能にする、核酸のための何らかの中間運搬媒体（ビヒクル）を含む。この種のベクターは、好ましくは細胞内で複製及び／又は発現され

る。この中間運搬媒体は、例えば、電気穿孔法、微粒子銃、リポソーム投与、アグロバクテリアを用いた導入、ＤＮＡ又はＲＮＡウイルスを介した挿入における使用に適合され得る。ベクターは、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ又はウイルスゲノムを含む。

本発明により同定される腫瘍関連抗原をコードする核酸は、宿主細胞のトランスフェクションのために使用し得る。本明細書における核酸は、組換えＤＮＡ及びＲＮＡの両方を意味する。組換えＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型のインビトロ転写によって作製し得る。さらに、適用の前に配列の安定化、キャップ形成及びポリアデニル化によって修飾し得る。

【００９４】

本発明によれば、「宿主細胞」という用語は、外来性核酸で形質転換又はトランスフェクトされ得る何らかの細胞に関する。「宿主細胞」という用語は、本発明によれば、原核細胞（例えば、大腸菌）又は真核細胞（例えば、樹状細胞、Ｂ細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、Ｋ５６２細胞、酵母細胞及び昆虫細胞）を含む。ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ、霊長動物からの細胞のような哺乳動物細胞が特に好ましい。細胞は様々な組織型に由来し、一次細胞及び細胞株を含み得る。特定例は、ケラチノサイト、末梢血白血球、骨髄の幹細胞及び胚性幹細胞を含む。さらなる実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞、単球又はマクロファージである。核酸は、単一コピー又は２若しくはそれ以上のコピーの形態で宿主細胞内に存在することができ、１つの実施形態では、宿主細胞において発現される。

【００９５】

本発明によれば、「発現」という用語は、その最も一般的な意味で使用され、ＲＮＡの産生又はＲＮＡとタンパク質の産生を含む。この用語はまた、核酸の部分的発現を含む。さらに、発現は一過性に又は安定に実施され得る。哺乳動物細胞における好ましい発現系は、Ｇ４１８に対する耐性を付与する（それ故安定にトランスフェクトされた細胞株を選択することを可能にする）遺伝子のような選択マーカー及びサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のエンハンサープロモーター配列を含有する、ｐｃＤＮＡ３．１及びｐＲｃ／ＣＭＶ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を含む。

【００９６】

ＭＨＣ分子が腫瘍関連抗原又はその一部を提示する本発明の場合、発現ベクターはまた、上記ＭＨＣ分子をコードする核酸配列を含み得る。ＭＨＣ分子をコードする核酸配列は、腫瘍関連抗原若しくはその一部をコードする核酸と同じ発現ベクター上に存在し得るか、又は２つの核酸が異なる発現ベクター上に存在してもよい。後者の場合、２つの発現ベクターを細胞に同時トランスフェクトし得る。宿主細胞が腫瘍関連抗原若しくはその一部又はＭＨＣ分子のどちらも発現しない場合、それらの両方をコードする核酸を、同じ発現ベクター上又は異なる発現ベクター上で細胞にトランスフェクトし得る。細胞が既にＭＨＣ分子を発現する場合は、腫瘍関連抗原又はその一部をコードする核酸配列だけを細胞にトランスフェクトすることができる。

【００９７】

本発明はまた、核酸の検出及び／又はその量の測定のためのキットを含む。そのようなキットは、例えば、検出しようとする又はその量を測定しようとする核酸にハイブリダイズする一対の増幅プライマーを含む。プライマーは、好ましくは上記核酸の６～５０、特に１０～３０、１５～３０及び２０～３０個の連続するヌクレオチドの配列を含み、プライマー二量体の形成を回避するため、オーバーラップしていない。プライマーの一方は核酸の一方の鎖にハイブリダイズし、他方のプライマーは、核酸の増幅を可能にする配置で相補的な鎖にハイブリダイズする。

【００９８】

「アンチセンス分子」又は「アンチセンス核酸」は、核酸の発現を調節する、特に核酸の発現を低下させるために使用され得る。「アンチセンス分子」又は「アンチセンス核酸」という用語は、本発明によれば、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、修飾オリゴリボヌクレオチド又は修飾オリゴデオキシリボヌクレオチドであって

、特定遺伝子を含むＤＮＡ又は上記遺伝子のｍＲＮＡに生理的条件下でハイブリダイズして、それにより上記遺伝子の転写及び／又は上記ｍＲＮＡの翻訳を阻害するオリゴヌクレオチドを指す。本発明によれば、「アンチセンス分子」はまた、その天然プロモーターに対して逆方向に核酸又はその一部を含む構築物を包含する。核酸又はその一部のアンチセンス転写産物は、天然に生じるｍＲＮＡと二本鎖を形成することができ、これにより、ｍＲＮＡの蓄積又は翻訳を妨げ得る。もう１つの可能性は、核酸を不活性化するためのリボザイムの使用である。

【００９９】

本発明による好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的核酸の６～５０、特に１０～３０、１５～３０及び２０～３０個の連続するヌクレオチドの配列を有し、好ましくは標的核酸又はその一部に完全に相補的である。

【０１００】

好ましい実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、Ｎ末端又は翻訳開始部位、転写開始部位若しくはプロモーター部位のような５'側上流部位とハイブリダイズする。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、３'側非翻訳領域又はｍＲＮＡスプライシング部位とハイブリダイズする。

【０１０１】

１つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又はその組合せから成り、１つのヌクレオチドの５'末端ともう１つのヌクレオチドの３'末端がホスホジエステル結合によって互いに連結されている。これらのオリゴヌクレオチドは、従来の方法で合成され得るか又は組換えによって生産され得る。

【０１０２】

好ましい実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは「修飾」オリゴヌクレオチドである。本明細書では、オリゴヌクレオチドは、例えばその安定性又は治療効果を高めるために、その標的に結合する能力を損なわずに多種多様な方法で修飾され得る。本発明によれば、「修飾オリゴヌクレオチド」という用語は、（ｉ）そのヌクレオチドの少なくとも２個が合成ヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステル結合ではないヌクレオシド間結合）によって互いに連結されている、及び／又は（ｉｉ）通常は核酸内で認められない化学基がオリゴヌクレオチドに共有結合で連結されている、オリゴヌクレオチドを意味する。好ましい合成ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、リン酸エステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミデート、カルバメート、カルボネート、リン酸トリエステル、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル及びペプチドである。

【０１０３】

「修飾オリゴヌクレオチド」という用語はまた、共有結合で修飾された塩基及び／又は糖を有するオリゴヌクレオチドを包含する。「修飾オリゴヌクレオチド」は、例えば、３'位置のヒドロキシル基及び５'位置のリン酸基以外の低分子量有機基に共有結合で結合している糖残基を有するオリゴヌクレオチドを含む。修飾オリゴヌクレオチドは、例えば２'－Ｏ－アルキル化リボース残基又はリボースの代わりにアラビノースのような別の糖を含有し得る。

【０１０４】

オリゴヌクレオチドに関する上述されたすべての実施形態は、ポリヌクレオチドにも適用し得ることを理解されたい。

【０１０５】

本明細書で使用される「低分子干渉ＲＮＡ」又は「ｓｉＲＮＡ」とは、標的遺伝子又は分解されるべきｍＲＮＡを同定するために使用される、好ましくは１０ヌクレオチド長を超える、より好ましくは１５ヌクレオチド長を超える、最も好ましくは１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９又は３０ヌクレオチド長の単離ＲＮＡ分子を意味する。１９～２５ヌクレオチドの範囲がｓｉＲＮＡについての最も好ましい大きさである。

【０１０６】
本発明によるｓｉＲＮＡは、部分精製されたＲＮＡ、実質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、又は組換え生産されたＲＮＡ、並びに１又はそれ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は改変により、天然に生じるＲＮＡとは異なる変化したＲＮＡを包含し得る。そのような改変は、ｓｉＲＮＡの末端又はｓｉＲＮＡの１若しくはそれ以上の内部ヌクレオチドなどへの、非ヌクレオチド物質の付加；ｓｉＲＮＡをヌクレアーゼ消化に対して抵抗性にする修飾（例えば、２'置換リボヌクレオチドの使用、若しくは糖－リン酸骨格への修飾）；又はデオキシリボヌクレオチドによるｓｉＲＮＡ内の１若しくはそれ以上のヌクレオチドの置換を含み得る。さらに、ｓｉＲＮＡは、修飾オリゴヌクレオチドに関して前述したようにその安定性を高めるために、特に１又はそれ以上のホスホロチオエート結合を導入することによって、修飾され得る。

【０１０７】
ｓｉＲＮＡの一方の鎖又は両方の鎖はまた、３'突出部を含み得る。本明細書で使用される、「３'突出部」は、ＲＮＡ鎖の３'末端から伸長している少なくとも１つの非対合ヌクレオチドを指す。それ故１つの実施形態では、ｓｉＲＮＡは、１～約６ヌクレオチド（リボヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドを含む）長、好ましくは１～約５ヌクレオチド長、より好ましくは１～約４ヌクレオチド長、特に好ましくは約２～約４ヌクレオチド長の少なくとも１つの３'突出部を含む。ｓｉＲＮＡ分子の両方の鎖が３'突出部を含む実施形態では、突出部の長さは各々の鎖について同じか又は異なり得る。最も好ましい実施形態では、３'突出部はｓｉＲＮＡの両方の鎖に存在し、２ヌクレオチド長である。例えば、本発明のｓｉＲＮＡの各々の鎖は、ジデオキシチミジル酸（「ＴＴ」）又はジウリジル酸（「ｕｕ」）の３'突出部を含み得る。

【０１０８】
ｓｉＲＮＡの安定性を高めるために、３'突出部を分解に対して安定化することもできる。１つの実施形態では、突出部は、アデノシン又はグアノシンヌクレオチドのようなプリンヌクレオチドを含むことによって安定化される。あるいは、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば２'－デオキシチミジンによる３'突出部内のウリジンヌクレオチドの置換は耐容され、ＲＮＡｉ分解の効率に影響を及ぼさない。特に、２'－デオキシチミジン内に２'－ヒドロキシルを存在させないことにより、組織培養培地における３'突出部のヌクレアーゼ耐性を有意に増強する。

【０１０９】
ｓｉＲＮＡのセンス鎖とアンチセンス鎖は、２つの相補的な一本鎖ＲＮＡ分子を含み得るか、又は２つの相補的な部分が塩基対合して、一本鎖「ヘアピン」領域によって共有結合で連結されている単一分子を含み得る。すなわち、センス領域とアンチセンス領域はリンカー分子を介して共有結合で連結され得る。リンカー分子は、ポリヌクレオチド又は非ヌクレオチドリンカーであり得る。理論に拘束されることを望むものではないが、後者の型のｓｉＲＮＡ分子のヘアピン領域は「ダイサー」タンパク質（又はその等価物）によって細胞内で切断され、２つの個別の塩基対合ＲＮＡ分子のｓｉＲＮＡを形成すると考えられる。

【０１１０】
本明細書で使用される、「標的ｍＲＮＡ」は、下方調節のための標的であるＲＮＡ分子を指す。

【０１１１】
ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターからのＲＮＡの発現は最初の転写ヌクレオチドがプリンであるとき唯一効率的であると考えられているので、標的する部位を変化させずにｓｉＲＮＡをｐｏｌ　ＩＩＩ発現ベクターから発現させることができる。

【０１１２】
本発明によるｓｉＲＮＡは、標的ｍＲＮＡ配列（「標的配列」）のいずれかにおいて任意の一続きの約１９～２５個の連続ヌクレオチドを標的することができる。ｓｉＲＮＡについての標的配列を選択するための手法は、例えば、２００２年１０月１１日に改訂され

た、Ｔｕｓｃｈｌ Ｔ．ｅｔ ａｌ．，「Ｔｈｅ ｓｉＲＮＡ Ｕｓｅｒ Ｇｕｉｄｅ」に記載されており、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる。「Ｔｈｅ ｓｉＲＮＡ Ｕｓｅｒ Ｇｕｉｄｅ」は、ワールドワイドウエブ上のＤｒ．Ｔｈｏｍａｓ Ｔｕｓｃｈｌ，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｏｆ ＲＮＡ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｒｏｃｋｅｆｅｌｌｅｒ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＵＳＡによって維持されているウエブサイトで入手可能であり、ｔｈｅ Ｒｏｃｋｅｆｅｌｌｅｒ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙのウエブサイトにアクセスし、「ｓｉＲＮＡ」のキーワードで検索することによって見出すことができる。故に、本発明のｓｉＲＮＡのセンス鎖は、標的ｍＲＮＡ内の任意の連続する一続きの約１９～約２５ヌクレオチドと実質的に同一のヌクレオチド配列を含む。

【０１１３】

一般に、標的ｍＲＮＡ上の標的配列は、好ましくは開始コドンから５０～１００ヌクレオチド下流（すなわち、３'側方向）の、標的ｍＲＮＡに対応する所与のｃＤＮＡ配列から選択できる。しかしながら、標的配列は、５'又は３'非翻訳領域、又は開始コドンに近接する領域に位置し得る。

【０１１４】

ｓｉＲＮＡは、当業者の公知の多くの手法を用いて入手できる。例えば、ｓｉＲＮＡは、化学合成することができるか又は、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｔｕｓｃｈｌ ｅｔ ａｌ．の米国公開特許出願第２００２／００８６３５６号に記載されているショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ）インビトロ系のような当技術分野で公知の方法を用いて組換え生産することができる。

【０１１５】

好ましくは、ｓｉＲＮＡは、適切に保護されたリボヌクレオシドホスホルアミダイト及び従来のＤＮＡ／ＲＮＡ合成装置を用いて化学合成される。ｓｉＲＮＡは、２個の別々の相補的なＲＮＡ分子として、又は２つの相補的な領域を有する１個のＲＮＡ分子として合成され得る。

【０１１６】

あるいは、ｓｉＲＮＡはまた、何らかの適切なプロモーターを使用して組換え環状又は直鎖状ＤＮＡプラスミドから発現させることができる。そのような実施形態は、本明細書においてｓｉＲＮＡの投与又はｓｉＲＮＡの医薬組成物への組込みに言及するとき、本発明により包含される。

【０１１７】

プラスミドから本発明のｓｉＲＮＡを発現するための適切なプロモーターは、例えばＵ６又はＨ１ ＲＮＡ ｐｏｌ ＩＩＩプロモーター配列及びサイトメガロウイルスプロモーターを含む。

【０１１８】

他の適切なプロモーターの選択は当業者の技術範囲内である。本発明の組換えプラスミドはまた、特定組織又は特定細胞内環境におけるｓｉＲＮＡの発現のための誘導的又は調節可能なプロモーターを含み得る。

【０１１９】

組換えプラスミドから発現されるｓｉＲＮＡは、培養細胞発現系から標準的手法によって単離され得るか、又は細胞内で発現され得る。インビボでｓｉＲＮＡを細胞に送達するための組換えプラスミドの使用について、以下詳細説明する。ｓｉＲＮＡは、２個の別々の相補的なＲＮＡ分子として、又は２つの相補的な領域を有する１個のＲＮＡ分子として組換えプラスミドから発現され得る。

【０１２０】

ｓｉＲＮＡを発現するのに適したプラスミドの選択、ｓｉＲＮＡを発現するための核酸配列をプラスミドに挿入するための方法、及び組換えプラスミドを対象細胞に送達する方法は、当業者の技術範囲内である。

【０１２１】

ｓｉＲＮＡはまた、インビボで組換えウイルスベクターから細胞内で発現され得る。組換えウイルスベクターは、ｓｉＲＮＡをコードする配列及びｓｉＲＮＡ配列を発現するための何らかの適切なプロモーターを含む。組換えウイルスベクターはまた、特定組織又は特定細胞内環境におけるｓｉＲＮＡの発現のための誘導的又は調節可能なプロモーターを含み得る。ｓｉＲＮＡは、２個の別々の相補的なＲＮＡ分子として又は２つの相補的な領域を有する１個のＲＮＡ分子として組換えウイルスベクターから発現され得る。

【０１２２】

「ペプチド」という用語は、オリゴペプチド及びポリペプチドを含み、ペプチド結合によって共有結合で連結された２又はそれ以上、好ましくは３又はそれ以上、好ましくは４又はそれ以上、好ましくは６又はそれ以上、好ましくは８又はそれ以上、好ましくは１０又はそれ以上、好ましくは１３又はそれ以上、好ましくは１６又はそれ以上、好ましくは２１又はそれ以上、及び好ましくは８、１０、２０、３０、４０又は５０まで、特に１００までのアミノ酸を含む物質を指す。「タンパク質」という用語は、大きなペプチド、好ましくは１００を超えるアミノ酸残基を有するペプチドを指すが、一般に「ペプチド」と「タンパク質」という用語は同義語であり、本明細書において同義的に使用される。

【０１２３】

好ましくは、本発明により記述されるタンパク質及びペプチドは単離されている。「単離タンパク質」又は「単離ペプチド」という用語は、タンパク質又はペプチドがその自然環境から分離されていることを意味する。単離タンパク質又はペプチドは、基本的に精製された状態であり得る。「基本的に精製された」という用語は、タンパク質又はペプチドが、自然界で又はインビボで結合している他の物質を基本的に含まないことを意味する。

【０１２４】

そのようなタンパク質及びペプチドは、例えば、抗体を作製するとき及び免疫学的アッセイ若しくは診断アッセイにおいて又は治療薬として使用し得る。本発明により記述されるタンパク質及びペプチドは、組織又は細胞ホモジネートのような生物学的試料から単離され得、また、多種多様な原核生物又は真核生物発現系において組換え発現され得る。

【０１２５】

本発明に関して、タンパク質又はペプチドの「誘導体」又はアミノ酸配列の「誘導体」は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸欠失変異体及び／又はアミノ酸置換変異体を含む。

【０１２６】

アミノ酸挿入変異体は、アミノ末端及び／又はカルボキシ末端融合、並びに特定アミノ酸配列内の単一アミノ酸又は２若しくはそれ以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変異体の場合は、１又はそれ以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列内の特定部位に挿入されるが、生じる産物の適切なスクリーニングを伴うランダム挿入も可能である。

【０１２７】

アミノ酸欠失変異体は、配列からの１又はそれ以上のアミノ酸の除去によって特徴づけられる。

【０１２８】

アミノ酸置換変異体は、配列内の少なくとも１個の残基が除去され、別の残基がその位置に挿入されることによって特徴づけられる。相同なタンパク質又はペプチドの間で保存されていないアミノ酸配列内の位置に修飾があること及び／又はアミノ酸を類似の性質を有する他のアミノ酸で置換することが好ましい。

【０１２９】

「保存的置換」は、例えば、類似する極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び／又は関与する残基の両親媒性に基づいて実施し得る。例えば：（ａ）非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンを含む；（ｂ）極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンを含む；（ｃ）正に荷電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リシン及びヒスチジンを含む；並びに（ｄ）負

に荷電した（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含む。置換は、典型的には（ａ）～（ｄ）の群の中で実施し得る。加えて、グリシンとプロリンは、α－ヘリックスを破壊するそれらの能力に基づき互いに置換され得る。一部の好ましい置換は、以下の群の中で実施し得る：（ｉ）ＳとＴ；（ｉｉ）ＰとＧ；及び（ｉｉｉ）Ａ、Ｖ、Ｌ及びＩ。公知の遺伝暗号、並びに組換え及び合成ＤＮＡ手法を考慮して、当業者は、保存的アミノ酸変異体をコードするＤＮＡを容易に構築することができる。

【０１３０】

好ましくは、本明細書で述べる特定アミノ酸配列と上記特定アミノ酸配列の誘導体であるアミノ酸配列との間の類似性の程度、好ましくは同一性の程度は、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、さらに一層好ましくは少なくとも９０％又は最も好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％である。類似性又は同一性の程度は、好ましくは少なくとも約２０、少なくとも約４０、少なくとも約６０、少なくとも約８０、少なくとも約１００、少なくとも約１２０、少なくとも約１４０、少なくとも約１６０、少なくとも約２００又は２５０アミノ酸の領域に関して与えられる。好ましい実施形態では、類似性又は同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長に対して与えられる。

【０１３１】

１つの実施形態では、特定タンパク質又はペプチドの誘導体である又は特定タンパク質又はペプチドの一部であるタンパク質又はペプチドは、特定タンパク質又はペプチドの関連する機能及び／又は活性を有する、すなわち特定タンパク質又はペプチドと同じ活性又は免疫学的性質を有し得る。

前述したアミノ酸変異体は、例えば固相合成（Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，１９６４）及び類似の方法又は組換えＤＮＡ操作のような公知のペプチド合成手法を用いて容易に作製し得る。置換、挿入又は欠失を有するタンパク質及びペプチドを作製するためのＤＮＡ配列の操作は、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）の中で詳細に説明されている。

【０１３２】

本発明によれば、タンパク質及びペプチドの「誘導体」はまた、炭水化物、脂質及び／又はタンパク質若しくはペプチドのような、上記タンパク質又はペプチドに関連する何らかの分子の単一又は複数の置換物、欠失物及び／又は付加物を含む。「誘導体」という用語はまた、上記タンパク質及びペプチドのすべての機能性の化学的等価物に及ぶ。

【０１３３】

本発明によれば、腫瘍関連抗原の一部又はフラグメントは、好ましくはそれが由来するタンパク質又はペプチドの機能的性質を有する。そのような機能的性質は、抗体との相互作用、他のペプチド又はタンパク質との相互作用、核酸の選択的結合及び酵素活性を含む。特定の性質は、ＭＨＣ分子と複合体を形成し、適切な場合、好ましくは細胞傷害性細胞又はＴヘルパー細胞を刺激することによって、免疫応答を生じる能力である。腫瘍関連抗原の一部又はフラグメントは、好ましくは腫瘍関連抗原の少なくとも６、特に少なくとも８、少なくとも１０、少なくとも１２、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも３０又は少なくとも５０の連続するアミノ酸の配列を含む。腫瘍関連抗原の一部又はフラグメントは、好ましくは腫瘍関連抗原の８まで、特に１０まで、１２まで、１５まで、２０まで、３０まで又は５５までの連続するアミノ酸の配列を含む。腫瘍関連抗原の一部又はフラグメントは、好ましくは、抗原の非膜貫通部分、特に細胞外部分に対応する又はそれから構成される腫瘍関連抗原の一部である。

【０１３４】

腫瘍関連抗原の好ましい部分又はフラグメントは、インビボでの細胞傷害性Ｔリンパ球の刺激に特に適するが、またエクスビボでの治療適合移入のために増殖され、刺激されたＴリンパ球の生産にも適する。

【０１３５】

腫瘍関連抗原をコードする核酸の一部又はフラグメントは、本発明によれば、少なくと

も腫瘍関連抗原をコードする及び／又は上記で定義された、上記腫瘍関連抗原の一部又はフラグメントをコードする、核酸の部分に関する。腫瘍関連抗原をコードする核酸の一部又はフラグメントは、好ましくはオープンリーディングフレームに対応する核酸の部分である。

【０１３６】

本発明によれば、特定実施形態は、腫瘍関連抗原に由来する「ドミナントネガティブ」タンパク質又はペプチドを提供することを含むべきである。ドミナントネガティブタンパク質又はペプチドは、細胞機構と相互作用することによって、活性タンパク質又はペプチドを細胞機構とのその相互作用から排除する又は活性タンパク質又はペプチドと競合し、それによって上記活性タンパク質の作用を低下させる、不活性タンパク質又はペプチド変異体である。

【０１３７】

標的タンパク質に特異的に結合する特異的抗体を含む抗血清は、様々な標準的工程によって調製できる；例えば、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ」ｂｙ Ｐｈｉｌｉｐ Ｓｈｅｐｈｅｒｄ，Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｄｅａｎ ＩＳＢＮ ０－１９－９６３７２２－９；「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」ｂｙ Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，ＩＳＢＮ：０８７９６９３１４２及び「Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ：Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＮＯ」ｂｙ Ｅｄｗａｒｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ＩＳＢＮ ０８７９６９５４４７参照。それにより、複合体膜タンパク質をそれらの天然形態で認識するアフィン（ａｆｆｉｎｅ）及び特異的抗体を作製することも可能である（Ａｚｏｒｓａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２２９：３５－４８，１９９９；Ａｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４３：１８９９－１９０４，１９８９；Ｇａｒｄｓｖｏｌｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３４：１０７－１１６，２０００）。これは、治療的に使用される予定の抗体の作製のため及び多くの診断適用のために特に適切である。これに関して、生理的に折りたたまれた形態で標的分子を発現する総タンパク質、細胞外部分配列並びに細胞で免疫することが可能である。

【０１３８】

モノクローナル抗体は、伝統的にハイブリドーマ技術を用いて作製される（技術的詳細については：「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ」ｂｙ Ｐｈｉｌｉｐ Ｓｈｅｐｈｅｒｄ，Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｄｅａｎ ＩＳＢＮ ０－１９－９６３７２２－９；「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」ｂｙ Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ ＩＳＢＮ：０８７９６９３１４２；「Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ：Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＮＯ」ｂｙ Ｅｄｗａｒｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ＩＳＢＮ：０８７９６９５４４７参照）。

【０１３９】

抗体分子の小さな部分であるパラトープだけが、抗体がそのエピトープに結合することに関与することは公知である（Ｃｌａｒｋ，Ｗ．Ｒ．（１９８６），Ｔｈｅ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；Ｒｏｉｔｔ，Ｉ．（１９９１），Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｏｘｆｏｒｄ参照）。ｐＦｃ'及びＦｃ領域は、例えば、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原結合には関与しない。Ｆ（ａｂ'）$_2$フラグメントと称される、ｐＦｃ'領域が酵素的に除去された又はｐＦｃ'領域なしで生成された抗体は、完全抗体の両方の抗原結合部位を担持する。同様に、Ｆａｂフラグメントと称される、Ｆｃ領域が酵素的に除去された又は上記Ｆｃ

領域なしで生成された抗体は、無傷抗体分子の一方の抗原結合部位を担持する。さらに、Ｆａｂフラグメントは、共有結合で連結された抗体の軽鎖及びＦｄと称される、上記抗体の重鎖の一部から成る。Ｆｄフラグメントは抗体特異性の主要決定基であり（１つのＦｄフラグメントは、抗体の特異性を変化させずに１０までの異なる軽鎖と結合できる）、Ｆｄフラグメントは、単離されたとき、エピトープに結合する能力を保持する。

【０１４０】

抗体の抗原結合部分内に位置するのは、抗原エピトープと直接相互作用する相補性決定領域（ＣＤＲ）及びパラトープの三次構造を維持するフレームワーク領域（ＦＲ）である。ＩｇＧ免疫グロブリンの重鎖と軽鎖のＦｄフラグメントの両方が、各々３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１～ＣＤＲ３）によって分けられた４つのフレームワーク領域（ＦＲ１～ＦＲ４）を含む。ＣＤＲ、特にＣＤＲ３領域、さらに重鎖のＣＤＲ３領域は、かなりの程度まで抗体特異性に関与している。

【０１４１】

哺乳動物抗体の非ＣＤＲ領域は、元の抗体のエピトープに対する特異性を保持しながら、同じか又は異なる特異性を有する抗体の類似領域によって置換され得ることが公知である。これにより、機能的抗体を生産するために、非ヒトＣＤＲがヒトＦＲ及び／又はＦｃ／ｐＦｃ'領域に共有結合で連結されている「ヒト化」抗体の開発を可能にした。

【０１４２】

もう１つの例として、国際公開公報第ＷＯ９２／０４３８１号には、マウスＦＲ領域の少なくとも一部がヒト起源のＦＲ領域で置換されたヒト化マウスＲＳＶ抗体の生産とその使用について記載されている。抗原結合能力を有する無傷抗体のフラグメントを含む、この種の抗体は、しばしば「キメラ」抗体と称される。

【０１４３】

本発明によれば、「抗体」という用語はまた、抗体のＦ（ａｂ'）$_2$、Ｆａｂ、Ｆｖ及びＦｄフラグメント、Ｆｃ及び／又はＦＲ及び／又はＣＤＲ１及び／又はＣＤＲ２及び／又は軽鎖ＣＤＲ３領域が相同なヒト又は非ヒト配列で置換されているキメラ抗体、ＦＲ及び／又はＣＤＲ１及び／又はＣＤＲ２及び／又は軽鎖ＣＤＲ３領域が相同なヒト又は非ヒト配列で置換されているキメラＦ（ａｂ'）$_2$フラグメント抗体、ＦＲ及び／又はＣＤＲ１及び／又はＣＤＲ２及び／又は軽鎖ＣＤＲ３領域が相同なヒト又は非ヒト配列で置換されているキメラＦａｂフラグメント抗体、ＦＲ及び／又はＣＤＲ１及び／又はＣＤＲ２領域が相同なヒト又は非ヒト配列で置換されているキメラＦｄフラグメント抗体を包含する。「抗体」という用語はまた、「一本鎖」抗体を包含する。

【０１４４】

本発明はまた、腫瘍関連抗原に特異的に結合するタンパク質及びペプチドを含む。この種の結合物質は、例えば、単に溶液中で固定化形態で又はファージディスプレイライブラリーとして作製され得る縮重ペプチドライブラリーによって提供され得る。同様に、１又はそれ以上のアミノ酸を有するペプチドのコンビナトリアルライブラリーを作製することが可能である。ペプトイド及び非ペプチド合成残基のライブラリーも作製し得る。

【０１４５】

抗体はまた、腫瘍関連抗原を発現する細胞及び組織を提示するための特異的診断物質に連結し得る。それらはまた、治療上有用な物質にも連結し得る。

【０１４６】

診断物質又は診断薬は、（ｉ）検出可能なシグナルを提供する；（ｉｉ）第１若しくは第２の標識によって提供される検出可能なシグナルを修飾するように第２の標識と相互作用する、例えばＦＲＥＴ（蛍光共鳴エネルギー転移）；（ｉｉｉ）電荷、疎水性、形状若しくは他の物理的パラメータによって運動性、例えば電気泳動移動度に影響を及ぼす；又は（ｉｖ）捕捉部分、例えば親和性、抗体／抗原若しくはイオン錯体形成を提供する、ように機能する何らかの標識を含む。標識として適切であるのは、蛍光標識、発光標識、発色団標識、放射性同位体標識、同位体標識、好ましくは安定な同位体標識、同重体標識、酵素標識、粒子標識、特に金属粒子標識、磁性粒子標識、ポリマー粒子標識、ビオチンの

ような有機低分子、受容体のリガンド又は細胞接着タンパク質若しくはレクチンのような結合分子、結合物質の使用によって検出できる核酸及び／又はアミノ酸残基を含む標識配列等のような構造体である。診断物質は、非限定的に、硫酸バリウム、イオセタム酸、イオパノ酸、イポダートカルシウム、ナトリウムジアトリゾエート、メグルミンジアトリゾエート、メトリザミド、チロパノ酸ナトリウム、及びフッ素－１８及び炭素－１１のようなポジトロン放出核種、ヨウ素－１２３、テクネチウム－９９ｍ、ヨウ素－１３１及びインジウム－１１１のようなγ放射体、フッ素及びガドリニウムのような核磁気共鳴のための核種を含む放射性診断物質を含む。

【０１４７】

本発明によれば、「治療上有用な物質」、「治療物質」又は「治療薬」という用語は、治療効果を及ぼし得る何らかの分子を意味する。本発明によれば、治療上有用な物質は、好ましくは１又はそれ以上の腫瘍関連抗原を発現する細胞へと選択的に誘導され、抗癌剤、放射性ヨウ素標識化合物、毒素、細胞増殖抑制性又は細胞溶解性薬剤等を含む。抗癌剤は、例えば、アミノグルテチミド、アザチオプリン、硫酸ブレオマイシン、ブスルファン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シクロスポリン、シタラビディン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン（ｄａｕｎｏｒｕｂｉｎ）、ドキソルビシン、タキソール、エトポシド、フルオロウラシル、インターフェロンα、ロムスチン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトタン、塩酸プロカルバジン、チオグアニン、硫酸ビンブラスチン及び硫酸ビンクリスチンを含む。他の抗癌剤は、例えば、Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ，「Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」，８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９９０，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｉｎｃ．、特にＣｈａｐｔｅｒ ５２（Ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ（Ｐａｕｌ Ｃａｌａｂｒｅｓｉ ａｎｄ Ｂｒｕｃｅ Ａ．Ｃｈａｂｎｅｒ）に記載されている。毒素は、アメリカヤマゴボウ（ｐｏｋｅｗｅｅｄ）抗ウイルスタンパク質のようなタンパク質、コレラ毒素、百日咳毒素、リシン、ゲロニン、アブリン、ジフテリア外毒素又はシュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）外毒素であり得る。毒素残基はまた、コバルト－６０のような高エネルギー放出放射性核種であり得る。

【０１４８】

「主要組織適合遺伝子複合体」又は「ＭＨＣ」という用語は、すべての脊椎動物に存在する遺伝子の複合体に関する。ＭＨＣタンパク質又は分子は、ペプチドに結合して、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）による認識のためにそれらを提示することにより、正常免疫反応におけるリンパ球と抗原提示細胞の間のシグナル伝達に関与する。ＭＨＣ分子は、細胞内プロセシング画分内でペプチドに結合し、これらのペプチドをＴ細胞による認識のために抗原提示細胞の表面に提示する。ＨＬＡとも称されるヒトＭＨＣ領域は、第６番染色体上に位置し、クラスＩ及びクラスＩＩ領域を含む。本発明のすべての態様の１つの好ましい実施形態では、ＭＨＣ分子はＨＬＡ分子である。

【０１４９】

本明細書で使用される「低減する」又は「阻害する」は、参照試料（例えば、ｓｉＲＮＡで処理されていない試料）と比較してレベル、例えばタンパク質又はｍＲＮＡのレベルの好ましくは２０％又はそれ以上、より好ましくは５０％又はそれ以上、最も好ましくは７５％又はそれ以上の全体的低下を生じさせる能力を意味する。ＲＮＡ又はタンパク質発現のこの低減又は阻害は、標的ｍＲＮＡの切断又は分解を介して起こり得る。タンパク質発現又は核酸発現に関するアッセイは当技術分野において公知であり、例えば、タンパク質発現についてはＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロット分析、ＲＮＡについてはノーザンブロット法又はＲＮアーゼプロテクションアッセイを含む。

【０１５０】

「患者」という用語は、本発明によれば、ヒト、非ヒト霊長動物又は別の動物、特にウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコのような哺乳動物又はマウス及びラットのようなげっ歯動物を意味する。特に好ましい実施形態では、患者はヒトである。

【０１５１】
本発明によれば、「増大した」又は「増大した量」という用語は、好ましくは少なくとも１０％、特に少なくとも２０％、少なくとも５０％又は少なくとも１００％の増加を指す。物質の量はまた、試験試料では検出可能であるが参照試料中には存在しない又は検出不能である場合も、参照試料と比較して生物学的試料のような試験試料において増大している。
本発明によれば、「疾患」という用語は、腫瘍関連核酸及び／又は腫瘍関連抗原が発現される又は異常発現される何らかの病的状態を指す。「異常発現」は、本発明によれば、健常個体における状態と比較して、発現が変化している、好ましくは増大していることを意味する。発現の増大は、少なくとも１０％、特に少なくとも２０％、少なくとも５０％又は少なくとも１００％の増加を指す。１つの実施形態では、発現は疾患個体の組織においてのみ認められ、健常個体における発現は抑制されているか又は胎盤を除いて健常個体では抑制されている。そのような疾患の一例は癌であり、本発明による「癌」という用語は、白血病、精上皮腫、黒色腫、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、直腸癌、子宮内膜癌、腎癌、副腎癌、甲状腺癌、血液癌、皮膚癌、脳の癌、子宮頸癌、腸癌（ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、肝癌、結腸癌、胃癌、腸癌（ｉｎｔｅｓｔｉｎｅ　ｃａｎｃｅｒ）、頭頸部癌、消化器癌、リンパ節癌、食道癌、結腸直腸癌、膵癌、耳鼻咽喉（ＥＮＴ）癌、乳癌、前立腺癌、子宮の癌、卵巣癌及び肺癌並びにそれらの転移を含む。その例は、肺癌腫、乳癌腫、前立腺癌腫、結腸癌腫、腎細胞癌腫、子宮頸癌腫、又は前述した癌の種類又は腫瘍の転移である。本発明による癌という用語はまた、癌の転移を包含する。
【０１５２】
「腫瘍」とは、急速で制御されない細胞増殖によって成長し、新たな増殖を開始させた刺激が停止した後も成長し続ける細胞又は組織の異常な群を意味する。腫瘍は、構造機構及び正常組織との機能的協調の部分的又は完全な欠如を示し、通常、良性又は悪性であり得る明確な組織塊を形成する。
【０１５３】
「転移」とは、その元の部位から身体の別の部分への癌細胞の広がりを意味する。転移の形成は非常に複雑な過程であり、原発腫瘍からの悪性細胞の分離、細胞外マトリックスの侵襲、体腔及び脈管に入るための内皮基底膜の貫入、及び次に、血液によって輸送された後、標的器官の浸潤に依存する。最後に、標的部位における新たな腫瘍の成長は血管新生に依存する。腫瘍転移は、しばしば原発腫瘍が除去された後でも起こり、これは、腫瘍細胞又は成分が残存し、転移の潜在能を発現し得るからである。１つの実施形態では、本発明による「転移」という用語は、原発腫瘍及び局所リンパ節系から離れた転移に関連する「遠隔転移」に関する。
【０１５４】
本発明によれば、生物学的試料は、体液を含む組織試料及び／又は細胞試料であり得、パンチ生検を含む組織生検、及び血液、気管支吸引液、痰、尿、糞便又は他の体液を採取することのような従来の方法で入手し得る。本発明によれば、「生物学的試料」という用語はまた、血液試料の分画を包含する。好ましくは、本発明による「生物学的試料」という用語は胎盤組織に由来する試料を含まない。
【０１５５】
本発明によれば、「免疫反応性細胞」という用語は、適切な刺激によって免疫細胞（Ｂ細胞、Ｔヘルパー細胞又は細胞傷害性Ｔ細胞など）へと成熟することができる細胞を意味する。免疫反応性細胞は、ＣＤ３４$^{+}$造血幹細胞、未熟及び成熟Ｔ細胞並びに未熟及び成熟Ｂ細胞を含む。腫瘍関連抗原を認識する細胞溶解性又はＴヘルパー細胞の産生を所望する場合は、免疫反応性細胞を、細胞溶解性Ｔ細胞及びＴヘルパー細胞の産生、分化及び／又は選択を促進する条件下で、腫瘍関連抗原を発現する細胞と接触させる。Ｔ細胞前駆体の細胞溶解性Ｔ細胞への分化は、抗原に暴露されたとき、免疫系のクローン選択に類似する。

【０１５６】
「Ｔ細胞」及び「Ｔリンパ球」という用語は、本明細書では同義的に使用され、Ｔヘルパー細胞及び細胞溶解性Ｔ細胞を含む細胞傷害性Ｔ細胞を包含する。
【０１５７】
一部の治療方法は、１又はそれ以上の腫瘍関連抗原を提示する、癌細胞のような抗原提示細胞の溶解を生じさせる、患者の免疫系の反応に基づく。これに関連して、例えば腫瘍関連抗原とＭＨＣ分子との複合体に特異的な自己細胞傷害性Ｔリンパ球を、細胞異常を有する患者に投与する。インビトロでのそのような細胞傷害性Ｔリンパ球の産生は公知である。Ｔ細胞を分化させる方法の一例は、国際公開公報第ＷＯ－Ａ－９６３３２６５号に認められる。一般に、血液細胞のような細胞を含む試料を患者から採取し、その細胞を、上記複合体を提示し、細胞傷害性Ｔリンパ球（例えば、樹状細胞）の増殖を生じさせることができる細胞と接触させる。標的細胞は、ＣＯＳ細胞のようなトランスフェクトされた細胞であり得る。これらのトランスフェクト細胞は、所望の複合体をそれらの表面に提示し、細胞傷害性Ｔリンパ球と接触させたとき、後者の増殖を刺激する。次に、クローン増殖した自己細胞傷害性Ｔリンパ球を患者に投与する。
【０１５８】
抗原特異的細胞傷害性Ｔリンパ球を選択するもう１つの方法では、細胞傷害性Ｔリンパ球の特異的クローンを得るためにＭＨＣクラスＩ分子／ペプチド複合体の蛍光性四量体を使用する（Ａｌｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７４：９４－９６，１９９６；Ｄｕｎｂａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．８：４１３－４１６，１９９８）。
本発明はまた、適合移入と称される治療方法を含み（Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３６（５）：１９１７，１９８６；Ｒｉｄｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：２３８，１９９２；Ｌｙｎｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：１４０３－１４１０，１９９１；Ｋａｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ５９：６０３－６１４，１９８９）、この方法では、所望の複合体を提示する細胞（例えば、樹状細胞）を治療される患者の細胞傷害性Ｔリンパ球と組み合わせて、特異的細胞傷害性Ｔリンパ球の増殖を生じさせる。増殖した細胞傷害性Ｔリンパ球を、次に、特異的複合体を提示する特定異常細胞によって特徴づけられる細胞異常を有する患者に投与する。細胞傷害性Ｔリンパ球は、その後異常細胞を溶解し、それによって所望の治療効果を達成する。
【０１５９】
さらに、所望の複合体を提示する細胞（例えば、樹状細胞）を、高い親和性で特異的細胞傷害性Ｔリンパ球の増殖を生じさせ得る健常個体又は別の種（例えば、マウス）の細胞傷害性Ｔリンパ球と組み合わせ得る。これらの増殖した特異的Ｔリンパ球の高親和性Ｔ細胞受容体をクローニングし、場合により種々の程度にヒト化して、このようにして得られたＴ細胞受容体を、次に、例えばレトロウイルスベクターを使用して、患者のＴ細胞に遺伝子導入することにより形質導入し得る。その後、これらの遺伝的に改変したＴリンパ球を使用して適合移入を実施し得る（Ｓｔａｎｉｓｌａｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：９６２－７０，２００１；Ｋｅｓｓｅｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：９５７－６１，２００１）。
【０１６０】
適合導入は、本発明により適用できる唯一の治療形態ではない。細胞傷害性Ｔリンパ球はまた、それ自体公知の方法でインビボにて作製し得る。１つの方法は、複合体を発現する非増殖性細胞を使用する。本明細書で使用する細胞は、照射された腫瘍細胞又は複合体の提示のために必要な一方若しくは両方の遺伝子（すなわち、抗原性ペプチドと提示ＭＨＣ分子）でトランスフェクトされた細胞のような、通常は複合体を発現する細胞である。もう１つの好ましい形態は、組換えＲＮＡの形態での腫瘍関連抗原の導入であり、これは、例えばリポソーム移入又は電気穿孔法によって細胞に導入し得る。生じる細胞は対象複合体を提示し、自己細胞傷害性Ｔリンパ球によって認識されて、その後増殖する。

【０１６１】
抗原提示細胞への組込みをインビボで可能にするために、腫瘍関連抗原又はそのフラグメントをアジュバントと組み合わせることによって同様の作用を達成することができる。腫瘍関連抗原又はそのフラグメントは、タンパク質として、ＤＮＡ（例えば、ベクター内の）として又はＲＮＡとして示される。腫瘍関連抗原は、プロセシングされてＭＨＣ分子に対するペプチドパートナーを産生するが、一方そのフラグメントは、さらなるプロセシングを必要とせずに提示され得る。後者は特に、これらがＭＨＣ分子に結合できる場合に該当する。完全な抗原がインビボで樹状細胞によってプロセシングされる投与形態が好ましく、なぜならこれはまた、有効な免疫応答のために必要とされるＴヘルパー細胞応答も生じさせ得るからである（Ｏｓｓｅｎｄｏｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ．７４：７５－９，２０００；Ｏｓｓｅｎｄｏｒｐ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８７：６９３－７０２，１９９８）。一般に、例えば皮内注射によって、有効量の腫瘍関連抗原を患者に投与することが可能である。しかし、注射はまた、リンパ節内にも実施し得る（Ｍａｌｏｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９８：３２９９－３０３，２００１）。

【０１６２】
本発明において記述する医薬組成物及び治療方法はまた、本明細書で述べる疾患を治療的に処置する又は予防するための免疫又はワクチン接種のためにも使用し得る。本発明によれば、「免疫」又は「ワクチン接種」という用語は、好ましくは抗原に対する免疫応答の増大又は活性化に関する。腫瘍関連抗原又はそれをコードする核酸を使用することによる癌への免疫効果を試験するために動物モデルを使用することが可能である。例えば、ヒト癌細胞をマウスに導入して腫瘍を生じさせ、腫瘍関連抗原をコードする１又はそれ以上の核酸を投与し得る。癌細胞への効果（例えば、腫瘍径の縮小）を、核酸による免疫の有効性についての指標として測定し得る。

【０１６３】
免疫又はワクチン接種のための組成物の一部として、好ましくは１又はそれ以上の腫瘍関連抗原又はその刺激性フラグメントを、免疫応答を誘導するため又は免疫応答を増大させるために１又はそれ以上のアジュバントと共に投与する。アジュバントは、抗原に組み込まれる又は抗原と共に投与される、免疫応答を増強する物質である。アジュバントは、抗原貯蔵所（ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｓｅｒｖｏｉｒ）を提供し（細胞外に又はマクロファージ中に）、マクロファージを活性化する及び／又は特定リンパ球を刺激することによって免疫応答を増強し得る。アジュバントは公知であり、非限定的に、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ，ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ）、ＱＳ２１（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ）、ＤＱＳ２１（ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ Ｂｅｅｃｈａｍ；国際公開公報第ＷＯ９６／３３７３９号）、ＱＳ７、ＱＳ１７、ＱＳ１８及びＱＳ－Ｌ１のようなサポニン（Ｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌｓ ７：１７８－１８６，１９９７）、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、ビタミンＥ、モンタニド、ミョウバン、
ＣｐＧオリゴヌクレオチド（Ｋｒｅｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３７４：５４６－９，１９９５参照）並びにスクアラン及び／又はトコフェロールのような生分解性油から調製される様々な油中水型エマルションを含む。好ましくは、ペプチドをＤＱＳ２１／ＭＰＬとの混合物中で投与する。ＤＱＳ２１対ＭＰＬの比率は、典型的には約１：１０～１０：１、好ましくは約１：５～５：１、特に約１：１である。ヒトへの投与のためには、ワクチン製剤は、典型的には約１μｇ～約１００μｇの範囲内のＤＱＳ２１及びＭＰＬを含有する。

【０１６４】
患者の免疫応答を刺激する他の物質も投与し得る。例えば、リンパ球に対するそれらの調節特性の故に、サイトカインをワクチン接種において使用することが可能である。そのようなサイトカインは、例えば、ワクチンの防御作用を高めることが示されたインターロイキン１２（ＩＬ－１２）（Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６８：１４３２－１４３４，１９９５参

照）、ＧＭ－ＣＳＦ及びＩＬ－１８を含む。

【０１６５】

免疫応答を増強し、それ故ワクチン接種において使用し得る多くの化合物が存在する。上記化合物は、Ｂ７－１及びＢ７－２（それぞれＣＤ８０及びＣＤ８６）のようなタンパク質又は核酸の形態で提供される共刺激性分子を含む。

【０１６６】

本発明はまた、核酸、タンパク質又はペプチドの投与を提供する。タンパク質及びペプチドは、それ自体公知の方法で投与され得る。１つの実施形態では、核酸はエクスビボ法によって、すなわち患者から細胞を取り出し、腫瘍関連抗原を組み込むために上記細胞を遺伝的に修飾して、改変された細胞を患者に再導入することによって投与される。これは一般に、遺伝子の機能的コピーをインビトロで患者の細胞に導入すること及び遺伝的に改変された細胞を患者に再導入することを含む。遺伝子の機能的コピーは、遺伝的に改変された細胞において遺伝子が発現されることを可能にする調節エレメントの機能的制御下にある。トランスフェクション及び形質導入法は当業者に公知である。本発明はまた、ウイルス及び標的制御リポソームのようなベクターを使用することによってインビボで核酸を投与することを提供する。本発明において、核酸の医薬組成物への投与又は組込みに言及される場合、これは核酸がそのようなベクター内に存在する実施形態を含む。

【０１６７】

好ましい実施形態では、腫瘍関連抗原をコードする核酸を投与するためのウイルス又はウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス及び弱毒化ポックスウイルスを含むポックスウイルス、セムリキ森林ウイルス、レトロウイルス、シンドビスウイルス及びＴｙウイルス様粒子から成る群より選択される。アデノウイルス及びレトロウイルスが特に好ましい。レトロウイルスは、典型的には複製欠損型である（すなわち、感染性粒子を生成することができない）。

【０１６８】

インビトロ又はインビボで核酸を細胞に導入する方法は、核酸のリン酸カルシウム沈殿物のトランスフェクション、ＤＥＡＥと結合した核酸のトランスフェクション、対象核酸を担持する上記ウイルスによるトランスフェクション又は感染、リポソームを介したトランスフェクション等を含む。特定実施形態では、核酸に特定細胞を指向させることが好ましい。そのような実施形態では、核酸を細胞に投与するために使用される担体（例えば、レトロウイルス又はリポソーム）は、結合標的制御分子を有し得る。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体又は標的細胞上の受容体に対するリガンドのような分子を、核酸担体に組み込み得る又は結合し得る。好ましい抗体は、腫瘍関連抗原に選択的に結合する抗体を含む。リポソームを介した核酸の投与を所望する場合は、標的の制御及び／又は取込みを可能にするために、エンドサイトーシスに関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、リポソーム製剤に組み込み得る。そのようなタンパク質は、特定細胞型に特異的なキャプシドタンパク質又はそのフラグメント、インターナライズされるタンパク質に対する抗体、細胞内部位を指向するタンパク質等を含む。

【０１６９】

本発明の治療組成物は、医薬的に適合性の製剤中で投与され得る。そのような製剤は、通常、医薬的に適合性の濃度の塩、緩衝物質、防腐剤、担体、アジュバントのような補足的免疫増強物質、例えばＣｐＧオリゴヌクレオチド、サイトカイン、ケモカイン、サポニン、ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＲＮＡ並びに、必要に応じて、他の治療的に活性な化合物を含有し得る。

【０１７０】

本発明の治療的に活性な化合物は、注射又は注入を含む何らかの従来経路によって投与し得る。投与は、例えば経口的、静脈内、腹腔内、筋肉内経路、皮下的又は経皮的に実施し得る。好ましくは、抗体は、肺エアロゾルとして治療的に投与される。アンチセンス核酸は、好ましくは徐放静脈内投与によって投与される。

【０１７１】

本発明の組成物は有効量で投与される。「有効量」は、単独で又はさらなる投与物と共に所望の反応又は所望の効果を達成する量を指す。１又はそれ以上の腫瘍関連抗原の発現によって特徴づけられる特定疾患又は特定状態の治療の場合、所望の反応は、好ましくは疾患の経過の阻害に関する。これは、疾患の進行を緩慢にすること、特に疾患の進行を妨げる又は逆転させることを含む。疾患又は状態の治療における所望の反応はまた、上記疾患又は上記状態の発症の遅延又は発症の防止であり得る。本発明によれば、癌の診断又は治療はまた、既に形成された又は形成されるであろう癌転移の診断又は治療を含み得る。本発明によれば、「治療」という用語は、治療的処置及び予防的処置、すなわち予防を含む。

【０１７２】

本発明の組成物の有効量は、治療される状態、疾患の重症度、並びに患者の年齢、生理的状態、大きさ及び体重を含む患者の個体別パラメータ、治療の期間、付随する治療の種類（存在する場合）、特定投与経路及びこれらに類似の因子に依存する。

【０１７３】

本発明の医薬組成物は、好ましくは無菌であり、所望の反応又は所望の効果を生じさせるための治療的に活性な物質の有効量を含有する。

【０１７４】

本発明の組成物の投与される用量は、投与の種類、患者の状態、所望の投与期間等のような様々なパラメータに依存し得る。患者における反応が初期用量で不十分である場合は、より高用量（又は異なる、より限局された投与経路によって達成される効果的により高い用量）を使用し得る。

【０１７５】

一般に、１ｎｇ～１ｍｇ、好ましくは１０ｎｇ～１００μｇの腫瘍関連抗原の用量が、治療のため若しくは免疫応答を生じさせる又は増大させるために製剤され、投与される。腫瘍関連抗原をコードする核酸（ＤＮＡ及びＲＮＡ）の投与を所望する場合は、１ｎｇ～０．１ｍｇの用量が製剤され、投与される。

【０１７６】

本発明の医薬組成物は、一般に医薬的に適合性の量で及び医薬的に適合性の組成物中で投与される。「医薬的に適合性」という用語は、医薬組成物の活性成分の作用と相互作用しない非毒性物質を指す。この種の製剤は、通常、塩、緩衝物質、防腐剤、担体及び、必要に応じて、他の治療的に活性な化合物を含有し得る。薬剤中で使用されるとき、塩は医薬的に適合性でなければならない。しかし、医薬的に適合性ではない塩も、医薬的に適合性の塩を調製するために使用されてもよく、本発明に包含される。この種の薬理的及び医薬的に適合性の塩は、非限定的に、以下の酸から調製されるものを含む：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸等。医薬的に適合性の塩としてはまた、ナトリウム塩、カリウム塩又はカルシウム塩のような、アルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩等が調製され得る。

【０１７７】

本発明の医薬組成物は、医薬的に適合性の担体を含有し得る。本発明によれば、「医薬的に適合性の担体」という用語は、ヒトへの投与に適する、１又はそれ以上の適合性固体又は液体充填剤、希釈剤又は被包物質を指す。「担体」という用語は、適用を容易にするために活性成分が組み合わされる、天然又は合成の有機又は無機成分を指す。本発明の医薬組成物の成分は、通常は所望の医薬効果を実質的に損なう相互作用が生じない成分である。

【０１７８】

本発明の医薬組成物は、塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸及び塩中のリン酸のような適切な緩衝物質を含有し得る。

【０１７９】

医薬組成物はまた、必要に応じて、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン及びチメロサールのような適切な防腐剤を含有し得る。

【０１８０】
医薬組成物は、通常は均一投与形態で提供され、それ自体公知の方法で調製され得る。本発明の医薬組成物は、例えばカプセル、錠剤、ロゼンジ、溶液、懸濁液、シロップ、エリキシルの形態、又はエマルションの形態であり得る。
【０１８１】
非経口投与に適する組成物は、通常、好ましくは受容者の血液と等張である、活性化合物の滅菌水性又は非水性製剤を含む。適合性担体及び溶媒の例は、リンガー液及び等張塩化ナトリウム溶液である。加えて、通常は滅菌固定油が溶液又は懸濁液の媒質として使用される。
【０１８２】
本発明を以下の図面及び実施例によって詳細に説明するが、それらは例示のためにのみ使用されるものであり、限定を意図されない。図面の説明及び実施例により、同様に本発明に包含されるさらなる実施形態が当業者に到達可能である。
【実施例】
【０１８３】
本明細書で言及する技術及び方法は、それ自体公知の方法で実施され、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．に記載されている。キット及び試薬の使用を含むすべての方法は、特に指示されない限り製造者の取扱説明書に従って実施される。
（実施例１）
腫瘍において異常に活性化される胎盤特異的遺伝子のスクリーニング
【０１８４】
組織及び細胞株
【０１８５】
組織は、常套的診断又は治療手順の間のヒト余剰材料として入手し、使用時まで－８０℃で保存した。細胞株は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）及びＧｅｒｍａｎ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（ＤＳＭＺ）より購入した。
【０１８６】
ＲＮＡの単離及びマイクロアレイハイブリダイゼーション
【０１８７】
ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔプロトコール（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して全ＲＮＡを単離した。紫外分光法を用いて単離ＲＮＡの定量を実施し、A_{260}／A_{280}比及びＡｇｉｌｅｎｔバイオアナライザー（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の両方によって品質を決定した。５μｇの全ＲＮＡを、５ｐｍｏｌ／μｌのＴ７－オリゴ（ｄＴ）$_{24}$プライマーによるｃＤＮＡ合成のために使用し、「Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ－Ｓｙｓｔｅｍ」（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて４３℃で９０分間、ＲＴ－ＰＣＲを実施した。２番目の鎖の合成は完全ｃＤＮＡを用いて実施した。ｃＤＮＡ溶液を１６℃で２時間インキュベートし、続いて６Ｕ Ｔ４－ＤＮＡポリメラーゼと共に１６℃で２０分間インキュベートして、０．５Ｍ ＥＤＴＡ １０μｌを用いて反応を停止させた。ＧｅｎｅＣｈｉｐ Ｓａｍｐｌｅ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｍｏｄｕｌｅ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）を使用して二本鎖ｃＤＮＡを精製した後、製造者の取扱説明書に従ってビオチン－１１－ＣＴＰ及びビオチン－１６－ＵＴＰ（Ｅｎｚｏ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を添加したインビトロ転写反応により、ｃＤＮＡ試料から標識ｃＲＮＡを作製した。ｃＲＮＡをA_{260}によって定量し、ｌａｂｃｈｉｐバイオアナライザー（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して品質を決定した。高品質を有するｃＲＮＡ標本だけをさらなる分析のために選択した。断片化したｃＲＮＡ（１５μｇ）を使用して、０

．１ｍｇ／ｍｌニシン精子ＤＮＡ及び０．５ｍｇ／ｍｌアセチル化ウシ血清アルブミンを含むハイブリダイゼーションカクテル（１００ｍＭ ＭＥＳ、１Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０）３００μｌを調製した。アレイ間のハイブリダイゼーション効率を比較し、測定した転写レベルの定量を標準化するため、対照ｃＲＮＡを使用し、これをＥｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｃｏｎｔｒｏｌキット（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ，ＵＳＡ）に用いる成分として含めた。カクテルを９５℃で５分間加熱し、４５℃で５分間平衡させて、遠心分離によって清澄化した。カクテルをＨＧ Ｕ１３３ Ｐｌｕｓ ２．０アレイ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）に４５℃で１６時間ハイブリダイズした。アレイを洗浄し、製造者の取扱説明書に従ってＧｅｎｅＣｈｉｐ ｆｌｕｉｄｉｃｓ ｓｔａｔｉｏｎ ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＥｕｋＧＥ－ＷＳ２（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）を使用してストレプトアビジン結合フッ素で染色した。アレイをアルゴンイオンレーザー共焦点スキャナー（Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）で走査し、５７０ｎｍで検出した。Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｓｕｉｔｅバージョン５．０（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）を用いてデータを抽出し、遺伝子当たり２，５００の平均強度を達成するため線形にスケールした。テキストファイルをエクスポートして、各々の問合せオリゴヌクレオチドの完全にマッチするプローブ細胞又はミスマッチプローブ細胞の強度を決定した。加えて、ｍＲＮＡの５'末端と３'末端の比率を、２４のヒトハウスキーピング／メンテナンス遺伝子（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）を含むマイクロアレイ試験チップ（Ｔｅｓｔ３ Ａｒｒａｙ）を使用して６つの無作為に選択した標本（各群から２つ）について分析し、ＲＮＡの分解を認めなかった。

【０１８８】

バイオインフォマティクス解析

【０１８９】

ＧｅｎｅＣｈｉｐ（登録商標）Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ Ｓｏｆｔｗａｒｅ １．４（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）及びＡｒｒａｙＡｓｓｉｓｔソフトウエアパッケージ５．２（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を統計解析のために使用した。

【０１９０】

結果

【０１９１】

以下の表１に示す１８の正常組織及び以下の表２に示す種々の実体の３０の腫瘍細胞株からの試料のスクリーニングは、検討した正常組織の中では胎盤において及び腫瘍細胞株において発現される本明細書で述べる配列を生じさせた。

【０１９２】

【表１】

マイクロアレイ発現解析のために使用した組織

組織	数
胎盤	２
精巣	２
乳腺	２
胸腺	２
皮膚	２
肝臓	２
結腸	２
食道	２
胃	２
肺	２
腎臓	２
リンパ節	２
骨格筋	２
心筋	１
脳	１
小脳	１
休止ＰＢＭＣ	２
活性ＰＢＭＣ	２

【０１９３】

【表２】

マイクロアレイ発現解析のために使用した細胞株

細胞株	組織
ＢＴ－５４９	乳癌
ＭＤＡ－ＭＢ－２３１転移性	乳癌
ＭＤＡ－ＭＢ－２３１非転移性	乳癌
ＭＤＡ－ＭＢ－４３５Ｓ	乳癌
ＭＤＡ－ＭＢ－４６８	乳癌
ＳＫ－ＢＲ－３	乳癌
Ｃａｏｖ－３	卵巣癌
ＦＵ－ＯＶ	卵巣癌
ＮＩＨ－ＯＶＣＡＲ－３	卵巣癌
ＣＯＬＯ－２０５	結腸直腸癌
ＨＣＴ－１１６	結腸直腸癌
ＨＣＴ－１１６　ＤＫＯ	結腸直腸癌
ＨＣＴ－１５	結腸直腸癌
ＨＴ－２９	結腸直腸癌
ＬＯＶＯ	結腸直腸癌
ＳＷ－４８０	結腸直腸癌
ＣＰＣ－Ｎ	肺癌
ＬＯＵ－ＮＨ－９１	肺癌
ＳＨＰ－７７	肺癌
ＳＫ－ＭＥＳ－１	肺癌
ＮＣＩ－Ｈ－１８７	肺癌
ＮＣＩ－Ｈ－２０９	肺癌
ＮＣＩ－Ｈ－５２２	肺癌
ＤＵ－１４５	前立腺癌
ＬｎＣａＰ	前立腺癌
ＰＣ－３	前立腺癌
ＭＥＬ－ＪＵＳＯ	黒色腫
Ｍｕｒｏｗｓｋｙ	黒色腫
ＳＫ－ＭＥＬ－３７	黒色腫
ＨＥＬＡ	子宮頸癌

【０１９４】

（実施例２）

同定された腫瘍関連マーカーの確認

【０１９５】

１．ＲＮＡ発現の検査

【０１９６】

同定された腫瘍関連マーカーを、最初に、様々な組織から又は組織特異的細胞株から得られるＲＮＡを用いて確認する。腫瘍組織と比較した健常組織の差次的発現パターンはその後の治療適用のために決定的に重要であるので、標的遺伝子を、好ましくはこれらの組織試料を用いて特徴づける。

【０１９７】

全ＲＮＡを、分子生物学の標準的な方法によって天然組織試料から又は腫瘍細胞株から単離する。上記単離は、例えば、製造者の取扱説明書に従ってＲＮｅａｓｙ　Ｍａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号７５１６２）を用いて実施し得る。この単離方法は、カオトロピック試薬、グアニジンイソチオシアネートの使用に基づく。あるいは、酸性フェノールを単離のために使用することができる（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ　＆　Ｓａｃｃｈｉ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－１５９，１９８７）。組織をグアニジンイソチオシアネートを用いて調製した後、ＲＮＡを酸性フェノールで抽出し、その後

イソプロパノールで沈殿させて、ＤＥＰＣで処理した水に取る。
このようにした単離したＲＮＡ ２～４μｇを、その後、例えば製造者のプロトコールに従ってＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてｃＤＮＡに転写した。該当する製造者の標準プロトコールに従ってランダムヘキサマー（例えば、Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を使用してｃＤＮＡ合成を開始させる。品質管理のために、低い程度にのみ発現されるｐ５３遺伝子に特異的なプライマーを使用して、ｃＤＮＡを３０サイクルにわたって増幅する。ｐ５３陽性のｃＤＮＡ試料だけをその後の反応工程のために使用する。

【０１９８】

様々な正常及び腫瘍組織から並びに腫瘍細胞株から単離されたｃＤＮＡアーカイブに基づくＰＣＲ又は定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を用いて発現解析を実施することにより、標的を詳細に分析する。このために、上記反応混合物のｃＤＮＡ ０．５μｌを、特定製造者のプロトコールに従ってＤＮＡポリメラーゼ（例えば、１ＵのＨｏｔＳｔａｒＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｑｉａｇｅｎ）により増幅する（反応混合物の総容量：２５～５０μｌ）。上記ポリメラーゼと別に、増幅混合物は、０．３ｍＭ ｄＮＴＰ、反応緩衝液（ＤＮＡポリメラーゼの製造者に依存して、最終濃度１×）、及び各々０．３ｍＭの遺伝子特異的「センス」及び「アンチセンス」プライマーを含む。

【０１９９】

標的遺伝子の特異的プライマーは、可能な限り、ゲノム汚染が偽陽性結果を導くことがないように２つの異なるエクソンに位置するように選択する。非定量的エンドポイントＰＣＲでは、ＤＮＡを変性し、Ｈｏｔ－Ｓｔａｒｔ酵素を活性化するため、ｃＤＮＡを典型的には９５℃で１５分間インキュベートする。その後ＤＮＡを３５サイクル（９５℃、１分間、プライマー特異的ハイブリダイゼーション温度（約５５～６５℃）で１分間、アンプリコンを伸長させるために７２℃で１分間）増幅する。その後、ＰＣＲ混合物１０μｌをアガロースゲルに適用し、電場中で分画する。臭化エチジウムで染色することによってＤＮＡをゲル中で可視化し、ＰＣＲ結果を写真として記録する。

【０２００】

従来のＰＣＲに代わるものとして、標的遺伝子の発現は定量的リアルタイムＰＣＲによっても分析し得る。様々な分析システムがこの分析のために使用可能であり、その中で最もよく知られているのは、ＡＢＩ ＰＲＩＳＭ配列検出システム（ＴａｑＭａｎ，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、ｉＣｙｃｌｅｒ（Ｂｉｏｒａｄ）及びＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）である。前述したように、特異的ＰＣＲ混合物をリアルタイム装置における分析に供する。ＤＮＡインターカレート染料（例えば、臭化エチジウム、ＣｙｂｒＧｒｅｅｎ）を添加することにより、新たに合成されたＤＮＡを特異的な光励起によって可視化する（染料の製造者の取扱説明書に従って）。増幅の間に多数の時点で測定することにより、プロセス全体を観測し、標的遺伝子の核酸濃度を定量的に決定することが可能になる。ハウスキーピング遺伝子（例えば、１８ＳＲＮＡ、β－アクチン）を測定することによってＰＣＲ混合物を基準化する。蛍光標識ＤＮＡプローブを介した別の方法も、同様に特定組織試料の標的遺伝子の定量的決定を可能にする（Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓからのＴａｑＭａｎの適用参照）。

【０２０１】

図１に示すように、ＲＴ－ＰＣＲ分析において、胎盤は配列番号５４０の核酸配列を発現する唯一の健常組織として確認された。他のいずれの健常組織においても有意の発現を認めなかった。しかし、乳癌では高く且つ有意のレベルの発現を認めた。

【０２０２】

定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析は、配列番号５４０の核酸配列が分析した乳癌試料の大部分において有意のレベルで発現されることを明らかにした：図２参照。

【０２０３】

２．クローニング

【０２０４】

腫瘍関連マーカーのさらなる特徴づけのために必要とされる完全な標的遺伝子を、一般的な分子生物学的方法に従ってクローニングする（例えば、「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ Ｌｔｄ．，Ｗｉｌｅｙ ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃｅ）。標的遺伝子をクローニングするため又はその配列を分析するために、上記遺伝子を、最初に、校正機能を有するＤＮＡポリメラーゼ（例えば、ｐｆｕ、Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）によって増幅する。次にアンプリコンを標準的な方法によってクローニングベクターに連結する。陽性クローンを配列解析によって同定し、その後予測プログラムと公知のアルゴリズムを用いて特徴づける。

【０２０５】

３．タンパク質の予測

【０２０６】

本発明により見出される遺伝子（特にＲｅｆＳｅｑ ＸＭドメインからの遺伝子）は、完全長遺伝子のクローニング、オープンリーディングフレームの決定及びタンパク質配列の推定と解析を必要とし得る。

完全長配列をクローニングするために、ｃＤＮＡ末端の迅速な増幅及び遺伝子特異的プローブによるｃＤＮＡ発現ライブラリーのスクリーニングのための一般的なプロトコールを使用し得る（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．）。

このようにして見出されたフラグメントを集めた後、一般的な予測プログラムを用いて潜在的なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を予測することができる。ポリＡ尾部及びポリアデニル化モチーフの位置は潜在的遺伝子産物の方向をあらかじめ決定するので、その特定方向の３つのリーディングフレームだけが可能な６つのリーディングフレームの外側のままである。前者はしばしば、タンパク質をコードし得る十分に大きなオープンリーディングフレームを１つだけ生成するが、その他のリーディングフレームはあまりに多くの終結コドンを有しており、現実的なタンパク質をコードしない。選択的オープンリーディングフレームの場合、本物の（ａｕｔｈｅｎｔｉｃ）ＯＲＦの同定には、最適転写開始についてのコザック判定基準を考慮に入れること及び生じ得る推定タンパク質配列を解析することが助けとなる。上記ＯＲＦは、潜在的ＯＲＦから推定されたタンパク質に対する免疫血清を作製し、組織及び細胞株中の実際のタンパク質の認識に関してこの免疫血清を分析することによってさらに確認される。

【０２０７】

４．抗体の作製

【０２０８】

本発明により同定される腫瘍関連抗原は、例えば抗体を使用することによって特徴づけられる。本発明はさらに、抗体の診断的又は治療的使用を含む。抗体は、天然及び／又は変性状態のタンパク質を認識し得る（Ａｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４３：１８９９－１９０４，１９８９；Ｇａｒｄｓｖｏｌｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３４：１０７－１１６，２０００；Ｋａｙｙｅｍ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０８：１－８，１９９２；Ｓｐｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２２４：５１－６０，１９９９）。

【０２０９】

標的タンパク質に特異的に結合する特異的抗体を含む抗血清は、様々な標準的方法によって調製し得る：例えば、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ」ｂｙ Ｐｈｉｌｌｉｐ Ｓｈｅｐｈｅｒｄ，Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｄｅａｎ ＩＳＢＮ ０－１９－９６３７２２－９，「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」ｂｙ Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ ＩＳＢＮ：０８７９６９３１４２及び「Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉ

ｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ：Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＮＯ」ｂｙ Ｅｄｗａｒｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ＩＳＢＮ：０８７９６９５４４７参照。また本明細書では、天然形態の複合体膜タンパク質を認識するアフィン及び特異的抗体を作製することも可能である。（Ａｚｏｒｓａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２２９：３５－４８，１９９９；Ａｎｄｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４３：１８９９－１９０４，１９８９；Ｇａｒｄｓｖｏｌｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．２３４：１０７－１１６，２０００）。これは、治療的に使用される予定の抗体の作製において及び多くの診断適用のためにも特に重要である。このために、完全なタンパク質及び細胞外部分配列の両方を免疫のために使用し得る。

【０２１０】

ポリクローナル抗体の免疫と作製

【０２１１】

様々な免疫プロトコールが公表されている。ある種（例えば、ウサギ、マウス）を所望の標的タンパク質の初回注射によって免疫する。免疫原に対する動物の免疫応答を、定められた期間内に（前回の免疫後約２～４週間）２回目又は３回目の免疫によって増強することができる。上記動物から血液を採取し、再び種々の定められた時間間隔を置いた後、免疫血清を得る（４週間後に１回目の採血、その後２～３週間ごとに５回まで採取）。このようにして採取した免疫血清は、ウエスタンブロット法において、フローサイトメトリー、免疫蛍光法又は免疫組織化学によって標的タンパク質を検出し、特徴づけるために使用し得るポリクローナル抗体を含む。

【０２１２】

動物は通常４つの広く確立された方法のいずれかによって免疫されるが、他の方法も存在する。免疫は、標的タンパク質に特異的なペプチドを使用して、完全なタンパク質を使用して、又は実験的に若しくは予測プログラムを介して同定され得るタンパク質の細胞外部分配列を使用して実施し得る。予測プログラムは必ずしも完璧に機能するわけではないので、膜貫通ドメインによって互いから分離された２つのドメインを用いることも可能である。この場合、２つのドメインの１つは細胞外でなければならず、これはその後実験的に証明され得る（以下参照）。免疫は種々のサービス業者によって商業的に提供される。

【０２１３】

（１）最初の場合、ペプチド（長さ：８～１２アミノ酸）をインビトロ法によって合成し（場合により商業サービスによって実施される）、上記ペプチドを免疫のために使用する。通常は３回の免疫を実施する（例えば、５～１００μｇ／免疫の濃度とする）。

【０２１４】

（２）あるいは、組換えタンパク質を使用して免疫を実施し得る。このために、標的遺伝子のクローン化ＤＮＡを発現ベクターにクローニングし、標的タンパク質を、例えば無細胞インビトロで、細菌（例えば、大腸菌）中で、酵母（例えば、サッカロミセス・ポンベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ））中で、昆虫細胞中又は哺乳動物細胞中で、特定製造者（例えば、Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｑｉａｇｅｎ）の条件に従って合成する。また、ウイルス発現系（例えば、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス）を用いて標的タンパク質を合成することも可能である。上記系の１つにおいて合成された後、標的タンパク質を、通常はクロマトグラフィー法を使用することによって、精製する。これに関して、精製を助けるものとして分子足場（例えば、Ｈｉｓタグ、Ｑｉａｇｅｎ；ＦＬＡＧタグ、Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ；ＧＳＴ融合タンパク質）を有するタンパク質を免疫のために使用することも可能である。数多くのプロトコールが、例えば「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ Ｌｔｄ．，Ｗｉｌｅｙ ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃｅにおいて見出される。標的タンパク質を精製した後、前述したように免疫を実施する。

【０２１５】

（３）所望のタンパク質を内因的に合成する細胞株が利用可能である場合は、特異的抗血清を調製するためにこの細胞株を直接使用することも可能である。この場合は、各々約１～５×１０^{7}細胞で１～３回の注射によって免疫を実施する。

【０２１６】

（４）免疫はまた、ＤＮＡを注射することによっても実施し得る（ＤＮＡ免疫）。このために、標的遺伝子を、まず最初に標的配列が強力な真核生物プロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター）の制御下にあるように発現ベクターにクローニングする。その後、遺伝子銃を使用してＤＮＡ（例えば、１回の注射当たり１～１０μｇ）を生物（例えば、マウス、ウサギ）中の強い血流を有する毛細管領域に免疫原として移入する。移入されたＤＮＡは動物の細胞によって取り込まれ、標的遺伝子が発現されて、動物は最終的に標的タンパク質に対する免疫応答を発現する（Ｊｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌｓ １２：４１－４９，２００１；Ｋａｓｉｎｒｅｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｏｍｉｃｓ ２１：２８７－２９３，２００２）。

【０２１７】

モノクローナル抗体の作製

【０２１８】

モノクローナル抗体は、伝統的にハイブリドーマ技術を用いて作製される（技術的な詳細については、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ」ｂｙ Ｐｈｉｌｉｐ Ｓｈｅｐｈｅｒｄ，Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｄｅａｎ ＩＳＢＮ ０－１９－９６３７２２－９；「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ」ｂｙ Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ ＩＳＢＮ：０８７９６９３１４２，「Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ：Ｐｏｒｔａｂｌｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌ ＮＯ」ｂｙ Ｅｄｗａｒｄ Ｈａｒｌｏｗ，Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ＩＳＢＮ：０８７９６９５４４７参照）。同様に使用される新しい方法は、「ＳＬＡＭ」技術である。その技術においては、Ｂ細胞を全血から単離し、細胞をモノクローナルにする。その後、単離Ｂ細胞の上清をその抗体特異性に関して分析する。ハイブリドーマ技術と異なり、抗体遺伝子の可変領域を、次に、単細胞ＰＣＲによって増幅し、適切なベクターにクローニングする。このようにしてモノクローナル抗体の作製が加速される（ｄｅ Ｗｉｌｄｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０７：６１－６７，１９９７）。

【０２１９】

５．抗体を使用したタンパク質化学法（ｐｒｏｔｅｉｎ－ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｅｔｈｏｄｓ）による標的の確認

【０２２０】

前述したように作製され得る抗体は、以下のように標的タンパク質をさらに分析するために使用できる：

【０２２１】

抗体の特異性

【０２２２】

細胞培養に基づくアッセイとその後のウエスタンブロット法は、抗体が所望の標的タンパク質とのみ特異的に結合するという事実を明らかにするために最も適切である（様々な変法が、例えば「Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ Ｌｔｄ．，Ｗｉｌｅｙ ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃｅに記載されている）。証明のために、細胞を、強力な真核生物プロモーター（例えば、サイトメガロウイルスプロモーター；ＣＭＶ）の制御下にある標的タンパク質についてのｃＤＮＡでトランスフェクトする。多種多様な方法（例えば、電気穿孔法、リポソームに基づくトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法）が、細胞株をＤＮＡでトランスフェクトするために十分に確立されている（例えば、Ｌｅｍｏｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７５：４４１－７，１９９７）。代替

法として、標的遺伝子を内因的に発現する細胞株を使用することも可能である（標的遺伝子特異的ＲＴ－ＰＣＲを介した検出）。対照として、理想的な場合は、その後のウエスタンブロット法において分析した抗体の特異性を明らかにできるように、相同な遺伝子を実験の中で同時トランスフェクトする。

【０２２３】

その後のウエスタンブロット法では、標的タンパク質を含む可能性がある細胞培養物又は組織試料からの細胞を１％濃度のＳＤＳ溶液に溶解し、その過程でタンパク質を変性させる。溶解産物を８～１５％濃度の変性ポリアクリルアミドゲル（１％ＳＤＳを含む）上の電気泳動により大きさによって分画する（ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）。次に多くのブロット法（例えば、セミドライ電気ブロット法；Ｂｉｏｒａｄ）のうちの１つによって特異的膜（例えば、ニトロセルロース、Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　＆　Ｓｃｈｕｌｌ）にタンパク質を移す。所望のタンパク質をこの膜上で視覚化することができる。このために、最初に、標的タンパク質を認識する抗体と共に（希釈：上記抗体の特異性に依存して約１：２０～１：２００）膜を６０分間インキュベートする。洗浄工程後、マーカー（例えば、ペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼのような酵素）に結合されており、第１抗体を認識する第２抗体と共に、膜をインキュベートする。その後、呈色反応又は化学発光反応（例えば、ＥＣＬ，Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）において膜上で標的タンパク質を可視化することが可能である。標的タンパク質に対して高い特異性を有する抗体は、理想的な場合、所望のタンパク質自体だけを認識するはずである。

【０２２４】

標的タンパク質の局在化

【０２２５】

標的タンパク質の、インシリコアプローチで同定された膜局在化を確認するために様々な方法が使用される。前述した抗体を使用する、重要で十分に確立された方法は、免疫蛍光法（ＩＦ）である。このために、標的タンパク質を合成する（ＲＴ－ＰＣＲによるＲＮＡの検出若しくはウエスタンブロット法によるタンパク質の検出）又はさもなければプラスミドＤＮＡでトランスフェクトされた樹立細胞株の細胞を使用する。多種多様な方法（例えば、電気穿孔法、リポソームに基づくトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法）が、ＤＮＡによる細胞株のトランスフェクションのために十分に確立されている（例えば、Ｌｅｍｏｉｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７５：４４１－７，１９９７）。細胞にトランスフェクトされたプラスミドは、免疫蛍光法において、非修飾タンパク質をコードし得る又はさもなければ種々のアミノ酸マーカーを標的タンパク質に連結し得る。主要なマーカーは、例えば、様々な識別的蛍光形態の緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、高親和性の特異的抗体が利用可能である６～１２アミノ酸の短いペプチド配列、又はそのシステイン特異的蛍光物質を介して結合できる短いアミノ酸配列、Ｃｙｓ－Ｃｙｓ－Ｘ－Ｘ－Ｃｙｓ－Ｃｙｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）である。標的タンパク質を合成する細胞を、例えばパラホルムアルデヒド又はメタノールで固定する。次に細胞を、必要な場合は、界面活性剤（例えば、０．２％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）と共にインキュベートすることによって透過性を上げてもよい。細胞を、その後、標的タンパク質に対する又は結合マーカーの１つに対する一次抗体と共にインキュベートする。洗浄工程後、混合物を、第１抗体に結合する蛍光マーカー（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、Ｄａｋｏ）に連結された二次抗体と共にインキュベートする。このようにして標識された細胞を、次にグリセロールで覆い、製造者の取扱説明書に従って蛍光顕微鏡を用いて分析する。この場合は、使用する物質に依存して特異的励起によって特異的な蛍光発光が達成される。分析は通常、標的タンパク質に加えて、結合アミノ酸マーカー又はその局在化が文献で既に記述されている他のマーカータンパク質も染色される二重染色において、標的タンパク質の信頼し得る局在化、抗体の品質および標的タンパク質が確認される。ＧＦＰ及びその誘導体は特殊なケースであって、直接励起可能であり、それら自体が蛍光を発する。免疫蛍光法において、界面活性剤の使用を通して制御され得る膜透過性は、

免疫原性エピトープが細胞の内側に位置するのか又は細胞外であるのかを明らかにし得る。選択タンパク質の予測を、それ故、実験的に裏付けることができる。代替的な可能性は、フローサイトメトリーによって細胞外ドメインを検出することである。このために、細胞を非透過処理条件下で固定し（例えば、ＰＢＳ／アジ化ナトリウム／２％ＦＣＳ／５ｍＭ　ＥＤＴＡを用いる）、製造者の取扱説明書に従ってフローサイトメーターで分析する。細胞外エピトープだけが、この方法で分析される抗体によって認識され得る。免疫蛍光法との相違は、例えばヨウ化プロピジウム又はトリパンブルーを使用することによって死細胞と生細胞を識別することが可能であり、それ故偽陽性結果を回避できることである。

【０２２６】

もう１つの重要な検出法は、特定組織試料に関する免疫組織化学（ＩＨＣ）によるものである。この方法の目的は、機能的に無傷の組織集合体においてタンパク質の局在化を同定することである。ＩＨＣは特に、（１）腫瘍及び正常組織における標的タンパク質の量を推定することができる、（２）腫瘍及び健常組織中のどの程度の数の細胞が標的遺伝子を合成するかを分析する、並びに（３）標的タンパク質が検出可能である組織（腫瘍、健常細胞）中の細胞型を定義するために役立つ。あるいは、標的遺伝子のタンパク質の量は、デジタルカメラと適切なソフトウエア（例えば、Ｔｉｌｌｖｉｓｉｏｎ，Ｔｉｌｌ－ｐｈｏｔｏｎｉｃｓ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用した組織免疫蛍光法によって定量し得る。この技術は頻繁に公表されており、それ故染色及び顕微鏡検査の詳細は、例えば、「Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ　Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」ｂｙ　Ｄａｖｉｄ　Ｊ．，ＭＤ　Ｄａｂｂｓ　ＩＳＢＮ：０４４３０６５６６７又はｉｎ「Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ，Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，ａｎｄ　Ａｎｔｉｇｅｎ　Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ：Ｆｏｒ　Ｌｉｇｈｔ　ａｎｄ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｙ」ＩＳＢＮ：０３０６４６７７０４に認められる。抗体の性質の故に、意味のある結果を得るために種々のプロトコールを使用しなければならない（一例を以下で述べる）ことに留意すべきである。

【０２２７】

通常、組織学的に定義された腫瘍組織及び、参照として、対応する健常組織をＩＨＣにおいて使用する。標的遺伝子の存在がＲＴ－ＰＣＲ分析を通して公知である細胞株を陽性及び陰性対照として使用することも可能である。バックグラウンド対照は常に含めなければならない。

【０２２８】

ホルマリン固定し（別の固定法、例えばメタノールによる固定も可能である）、パラフィン包埋した厚さ４μｍの組織片をガラス支持体に載せ、例えばキシレンで脱パラフィン化する。試料をＴＢＳ－Ｔで洗浄し、血清中でブロックする。次いで第１抗体（希釈１：２～１：２０００）と共に１～１８時間インキュベートし、この場合、通常はアフィニティー精製された抗体を使用する。洗浄工程の後、アルカリホスファターゼ（代替酵素：例えばペルオキシダーゼ）に連結された、第１抗体に対する第２抗体と共に約３０～６０分間インキュベートする。続いてアルカリホスファターゼを使用した呈色反応を実施する（例えば、Ｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．３９：７４１－７４８，１９９１；Ｓｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔ．６４：６９３－７０２，１９９１参照）。抗体特異性を明らかにするため、あらかじめ免疫原を添加することによって反応をブロックできる。

【０２２９】

タンパク質修飾の分析

【０２３０】

例えばＮ－又はＯ－グリコシル化又はミリスチル化のような二次タンパク質修飾は、免疫原性エピトープの接近可能性を障害する、さらには完全に妨げる可能性があり、それ故抗体療法の効果に問題を生じさせ得る。さらに、二次修飾のタイプと量が正常組織と腫瘍組織で異なることがしばしば明らかにされている（例えば、Ｄｕｒａｎｄ　＆　Ｓｅｔａ，２０００；Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４６：７９５－８０５；Ｈａｋｏｍｏｒｉ，１９９６

；Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５６：５３０９－１８）。これらの修飾の分析は、それ故、抗体治療の成功のためには必要不可欠である。潜在的な結合部位は特異的アルゴリズムによって予測することができる。

【０２３１】

タンパク質修飾の分析は、通常ウエスタンブロット法（上記参照）によって行われる。通常数ｋＤａの大きさを有するグリコシル化は、特により大きな全体質量の標的タンパク質を導き、これはＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて分画できる。特異的Ｏ－及びＮ－グリコシド結合を検出するために、タンパク質溶解産物をインキュベートした後、Ｏ－又はＮ－グリコシラーゼ（それぞれの製造者の取扱説明書に従って、例えばＰＮガーゼ、エンドグリコシダーゼＦ、エンドグリコシダーゼＨ、Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を用いてＳＤＳによって変性する。これに続いて、前述したようにウエスタンブロット法を実施する。従って、グリコシダーゼとのインキュベーション後に標的タンパク質の大きさが縮小していれば、特異的グリコシル化を検出することができ、この方法で、修飾の腫瘍特異性を分析することも可能である。

【０２３２】

標的遺伝子の機能分析

【０２３３】

標的分子の機能はその治療的有用性のために極めて重要であり得るので、機能分析は治療的に利用可能な分子の特徴づけにおける重要な構成要素である。機能分析は、細胞培養実験において細胞内で又はさもなければ動物モデルを用いてインビボで実施され得る。これは、突然変異によって標的分子の遺伝子のスイッチを切ること（ノックアウト）又は標的配列を細胞又は生物に挿入すること（ノックイン）のいずれかを含む。従って、最初の場合は、分析しようとする遺伝子の機能喪失による細胞環境での機能的修飾を分析することが可能である（機能の喪失）。２番目の場合は、分析遺伝子の付加によって引き起こされる修飾を分析することができる（機能の獲得）。

【０２３４】

ａ．細胞における機能分析

【０２３５】

トランスフェクション。機能の獲得を分析するためには、標的分子の遺伝子を細胞に移入しなければならない。このために、標的分子の合成を可能にする細胞をＤＮＡでトランスフェクトする。通常、本明細書では標的分子の遺伝子は強力な真核生物プロモーター（例えば、サイトメガロウイルスプロモーター；ＣＭＶ）の制御下にある。多種多様な方法（例えば、電気穿孔法、リポソームに基づくトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法）が、細胞株をＤＮＡでトランスフェクトするために十分に確立されている（例えば、Ｌｅｍｏｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．７５：４４１－７，１９９７）。遺伝子は、ゲノムへの組込みを伴わずに一過性に、又は例えばネオマイシンによる選択後にゲノムへの組込みを伴って安定に合成し得る。

ＲＮＡ干渉（ｓｉＲＮＡ）。細胞内の標的分子の機能の完全な喪失を誘導し得る、標的遺伝子の発現の阻害を、細胞におけるＲＮＡ干渉（ｓｉＲＮＡ）技術によって生じさせ得る（Ｈａｎｎｏｎ，ＧＪ．２００２．ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ．Ｎａｔｕｒｅ ４１８：２４４-５１；Ｃｚａｕｄｅｒｎａ ｅｔ ａｌ．２００３．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．３１：６７０-８２）。このために、標的分子に特異的な約２０～２５ヌクレオチド長の短い二本鎖ＲＮＡ分子で細胞をトランスフェクトする。次に酵素処理によって標的遺伝子の特異的ＲＮＡの分解、そしてそれ故標的タンパク質の発現低下を生じさせ、結果として標的遺伝子を機能的に分析することを可能にする。

【０２３６】

トランスフェクション又はｓｉＲＮＡによって修飾された細胞株は、その後種々の方法で分析し得る。最も一般的な例を以下に列挙する。

【０２３７】

１．増殖及び細胞周期挙動

【０２３８】
細胞増殖を分析するために多様な方法が確立されており、様々な会社によって商業的に供給されている（例えば、Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；アッセイ方法の詳細は数多くの適用プロトコールに記載されている）。細胞培養実験における細胞数は、単に計数することによって又は細胞の代謝活性を測定する比色アッセイ（例えば、ｗｓｔ－１，Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）によって決定できる。代謝アッセイ法は、酵素マーカーを介して間接的に実験における細胞数を測定する。細胞増殖は、ＤＮＡ合成の速度を分析することによって、例えばブロモデオキシウリジン（ＢｒｄＵ）を添加し、組み込まれたＢｒｄＵを特異的抗体を介して比色分析によって検出することにより、直接測定し得る。

【０２３９】
２．アポトーシス及び細胞傷害性

【０２４０】
細胞のアポトーシス及び細胞傷害性を検出するための多くのアッセイ系が利用可能である。決め手となる特徴は、不可逆性で、いかなる場合にも細胞死を生じさせる、ゲノムＤＮＡの特異的で酵素依存性の断片化である。これらの特異的ＤＮＡフラグメントを検出するための方法は市販されている。利用可能なさらなる方法は、組織切片においてもＤＮＡの一本鎖切断を検出できるＴＵＮＥＬアッセイである。細胞の活力状態のマーカーとして役立つ変化した細胞透過性を介して、細胞傷害性が主として検出される。これは、一方では、細胞培養上清における細胞内で典型的に認められるマーカーの分析を含む。他方で、無傷細胞では吸収されない染料マーカーの吸収性を分析することも可能である。染料マーカーの最もよく知られている例はトリパンブルーとヨウ化プロピジウムであり、一般的な細胞内マーカーは、上清中で酵素的に検出できる乳酸デヒドロゲナーゼである。様々な商業的供給者（例えば、Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の様々なアッセイ系が利用可能である。

【０２４１】
３．遊走アッセイ

【０２４２】
細胞が遊走する能力は、好ましくはボイデンチャンバー（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｃｏｓｔａｒ）を使用した、特異的遊走アッセイにおいて分析される（Ｃｉｎａｍｏｎ　Ｇ．，Ａｌｏｎ　Ｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００３　Ｆｅｂ；２７３（１－２）：５３－６２；Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．２００１．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ．１２：１９３７－５６）。このために、特定細孔径を有するフィルター上で細胞を培養する。遊走できる細胞は、このフィルターを通って下にある別の培養容器中へと移動することができる。その後の顕微鏡分析は、標的分子の機能の獲得又は機能の喪失によって誘導される、変化した可能性のある遊走挙動の測定を可能にする。

【０２４３】
ｂ．動物モデルにおける機能分析

【０２４４】
標的遺伝子機能の分析のための細胞培養実験の可能な代替法は、動物モデルにおける複雑なインビボ実験である。細胞ベースの方法と比較して、これらのモデルは、生物全体に関してのみ検出可能である発育不全又は疾患を検出できるという利点を有する。今日では、ヒト疾患のための多くのモデルが利用可能である（Ａｂａｔｅ－Ｓｈｅｎ　＆　Ｓｈｅｎ．２００２．Ｔｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓ１－５；Ｍａｔｓｕｓｕｅ　ｅｔ　ａｌ．２００３．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１１：７３７－４７）。例えば酵母、線虫又はゼブラフィッシュなどの様々な動物モデルが、その後集中的に特徴づけられてきた。しかし、他の種に比べて好ましいモデルは、例えばマウス（ハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ））のような哺乳動物モデルであり、それらはヒトでの生物学的プロセスを最もよく再現する可能性を提供するからである。マウスに関しては、一方で、マウスゲノムに新しい遺伝子を組み込むトランスジェニック法が近年確立された（機能の

獲得；Ｊｅｇｓｔｒｕｐ Ｉ．ｅｔ ａｌ．２００３．Ｌａｂ Ａｎｉｍ．２００３ Ｊａｎ．；３７（１）：１-９）。他方で、他の系統的なアプローチは、マウスゲノムにおける遺伝子のスイッチを切り、それによって所望の遺伝子の機能の喪失を誘導する（ノックアウトモデル、機能の喪失；Ｚａｍｂｒｏｗｉｃｚ ＢＰ ＆ Ｓａｎｄｓ ＡＴ．２００３．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．２００３ Ｊａｎ；２（１）：３８－５１；Ｎｉｗａ Ｈ．２００１．Ｃｅｌｌ Ｓｔｒｕｃｔ．Ｆｕｎｃｔ．２００１ Ｊｕｎ；２６（３）：１３７－４８）；技術的な詳細は数多く公表されている。

【０２４５】

マウスモデルが作製された後、導入遺伝子によって又は遺伝子の機能喪失によって誘導される変化を生物全体において分析することができる（Ｂａｌｌｉｎｇ Ｒ，２００１．Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．２：４６３－９２）。従って、例えば挙動試験を実施すること並びに確立された血液パラメータを生化学的に検討することが可能である。組織学的分析、免疫組織化学又は電子顕微鏡検査は、変化を細胞レベルで特徴づけることを可能にする。遺伝子の特異的発現パターンはインサイチューハイブリダイゼーションによって検出できる（Ｐｅｔｅｒｓ Ｔ．ｅｔ ａｌ．２００３．Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ １２：２１０９－２０）。

【０２４６】

（実施例３）

同定された腫瘍関連マーカーの詳細な分析

【０２４７】

ＲＮＡの単離、ＲＴ－ＰＣＲ及びリアルタイムＲＴ－ＰＣＲ

【０２４８】

ＲＮＡの抽出、一本鎖ｃＤＮＡの合成、ＲＴ－ＰＣＲ及びリアルタイムＲＴ－ＰＣＲは、先に記述されているように実施した（Ｋｏｓｌｏｗｓｋｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６２，６７５０－６７５５（２００２），Ｋｏｓｌｏｗｓｋｉ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６４，５９８８－５９９３（２００４））。リアルタイムの定量的発現分析は、４０サイクルのＲＴ－ＰＣＲにおいて実施した。ＨＰＲＴ（センス：５'－ＴＧＡ ＣＡＣ ＴＧＧ ＣＡＡ ＡＡＣ ＡＡＴ ＧＣＡ－３'；アンチセンス：５'－ＧＧＴ ＣＣＴ ＴＴＴ ＣＡＣ ＣＡＧ ＣＡＡ ＧＣＴ－３'、６２℃でアニーリング）に基準化した後、腫瘍試料中の遺伝子特異的転写産物を、ΔΔＣＴ計算を用いて正常組織に対して数量化した。

【０２４９】

ｓｉＲＮＡ二本鎖

【０２５０】

配列番号５４０のｓｉＲＮＡ二本鎖（Ｑｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）は、配列番号５４０のｍＲＮＡ配列の標的配列、５'－ＮＮＣ ＣＡＣ ＡＧＡ ＡＧＧ ＵＡＣ ＣＡＧ ＵＵＡ－３'（ｓｉＲＮＡ Ｎｏ．１；センス（５'－ＣＣＡ ＣＡＧ ＡＡＧ ＧＵＡ ＣＣＡ ＧＵＵ ＡＵＵ－３'）、アンチセンス（５'－ＵＡＡ ＣＵＧ ＧＵＡ ＣＣＵ ＵＣＵ ＧＵＧ ＧＵＵ－３'））及び５'－ＮＮＣ ＡＧＣ ＡＡＧ ＡＣＵ ＣＣＣ ＵＣＵ ＡＡＡ－３'（ｓｉＲＮＡ Ｎｏ．２；センス（５'－ＣＡＧ ＣＡＡ ＧＡＣ ＵＣＣ ＣＵＣ ＵＡＡ ＡＵＵ－３'）、アンチセンス（５'－ＵＵＵ ＡＧＡ ＧＧＧ ＡＧＵ ＣＵＵ ＧＣＵ ＧＵＵ－３'））を対象とした。

【０２５１】

細胞増殖分析

【０２５２】

ｓｉＲＮＡ二本鎖によるトランスフェクションの２４時間後に、１０％ＦＣＳを添加した培地中で1×10^4細胞を４８時間培養した。Ｗａｌｌａｃ Ｖｉｃｔｏｒ^{2}マルチラベルカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）でＤＥＬＦＩＡ細胞増殖キット（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）を製造者の取扱説明書に従って使用して、新たに合成されたＤＮＡ鎖へのＢｒｄＵの組込みを測定することによっ

て増殖を分析した。

【０２５３】

図３は、ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドによるトランスフェクションの２４時間後のリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによるＭＣＦ－７乳癌細胞での配列番号５４０のｍＲＮＡ発現の定量を示す。非トランスフェクト細胞及び非サイレンシング（ｎｓ）ｓｉＲＮＡでトランスフェクトした細胞と比較して、２つの配列番号５４０特異的ｓｉＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ Ｎｏ．１（配列番号 ６３０、６３１）、ｓｉＲＮＡ Ｎｏ．２（配列番号６３２、６３３））は、配列番号５４０発現の強固なサイレンシングを誘導する。

【０２５４】

図４は、ｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドを用いたトランスフェクションによる配列番号５４０発現のサイレンシングが、ＭＣＦ－７乳癌細胞の増殖障害を生じさせることを示す。ｓｉＲＮＡによるトランスフェクションの９６時間後に、新たに合成されたＤＮＡ鎖へのＢｒｄＵの組込みを測定することによって増殖を定量した。これらの結果は、配列番号５４０が乳癌細胞の増殖のための正の因子であることを示す。

【０２５５】

配列番号５４１のヌクレオチド配列は、配列番号６５から推定され、未知の機能の１７７アミノ酸のタンパク質（配列番号５４２）をコードする。正常組織及び癌組織における配列番号５４１の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５４３、５４４）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図５参照。正常組織では、配列番号５４１は胎盤において高発現され、胸腺で弱い発現だけを示す。配列番号５４１は肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５４１及びその発現産物は、標的治療のための、特にこの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２５６】

配列番号５４５のヌクレオチド配列は、配列番号２４９から推定され、膜タンパク質の溶質担体（ＳＬＣ）群の成員（配列番号５４６）をコードする。内在性膜タンパク質に特有であるように、ＳＬＣは、親水性細胞内又は細胞外ループによって互いに結合された多くの疎水性膜貫通αヘリックスを含む。ＳＬＣに依存して、これらの輸送体はモノマーとして又はオブリゲート（ｏｂｌｉｇａｔｅ）ホモオリゴマー若しくはヘテロオリゴマーとして機能性である。配列番号５４５によってコードされるタンパク質は細胞表面タンパク質である。正常組織及び癌組織における配列番号５４５の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５４７、５４８）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図６参照。正常組織と比較して、配列番号５４５は悪性黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５４５及びその発現産物は、標的治療のための、特にこの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２５７】

配列番号５４９のヌクレオチド配列は、配列番号４から推定され、未知の機能の７６３アミノ酸のタンパク質（配列番号５５０）をコードする。このタンパク質は２つの潜在的膜貫通ドメイン及び１つの典型的なフィブロネクチンＩＩＩ型ドメインを保持する。フィブロネクチンは、膜貫通受容体タンパク質（インテグリン）に結合する高分子量の細胞外マトリックス糖タンパク質である。インテグリンに加えて、それらはまたコラーゲン、フィブリン及びヘパリン硫酸などの細胞外マトリックス成分にも結合する。配列番号５４９によってコードされるタンパク質は、これまでのところ未知の新しいフィブロネクチン様タンパク質であり得る。正常組織及び癌組織における配列番号５４９の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５５１、５５２）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図７参照。正常組織と比較して、配列番号５４９は卵巣癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５４９及びその発現産物は、標的治療のための、特にこの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２５８】
配列番号５５３のヌクレオチド配列は、配列番号１５６から推定され、未知の機能の４９６アミノ酸のタンパク質（配列番号５５４）をコードする。このタンパク質は潜在的膜貫通タンパク質を保持する。正常組織及び癌組織における配列番号５５３の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５５５、５５６）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図８参照。正常組織では、配列番号５５３は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５５３は結腸癌及び卵巣癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５５３及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２５９】
配列番号５５７のヌクレオチド配列は、配列番号２７３から推定された。配列番号５５７は、明らかなオープンリーディングフレームを有さない部分ｃＤＮＡである。正常組織及び癌組織における配列番号５５７の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５５８、５５９）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図９参照。正常組織では、配列番号５５７の高発現は乳房において検出可能である。正常組織と比較して、配列番号５５７は乳癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５５７及びその発現産物は、標的治療のための、特にこの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６０】
配列番号５６０のヌクレオチド配列は、配列番号１３５から推定された。配列番号５６０は明らかなオープンリーディングフレームを有さない。正常組織及び癌組織における配列番号５６０の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５６１、５６２）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１０参照。正常組織では、配列番号５６０の発現は十二指腸及び結腸において検出可能である。正常組織と比較して、配列番号５６０は結腸癌及び卵巣癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５６０及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６１】
配列番号５６３のヌクレオチド配列は、配列番号１７７から推定された。配列番号５６３は明らかなオープンリーディングフレームを有さない。正常組織及び癌組織における配列番号５６３の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５６４、５６５）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１１参照。配列番号５６３は胎盤において高発現される。正常組織と比較して、配列番号５６３は乳癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５６３及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６２】
配列番号５６６のヌクレオチド配列は、配列番号１４９から推定され、未知の機能の１５５アミノ酸のタンパク質（配列番号５６７）をコードする。このタンパク質配列は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの成員と部分的に相同であり、潜在的膜貫通ドメインを保持する。配列番号５６６によってコードされるタンパク質は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーの新しい成員であり得る。正常組織及び癌組織における配列番号５６６の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５６８、５６９）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１２参照。正常組織と比較して、配列番号５６６は胃癌、乳癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５６６及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６３】
配列番号５７０のヌクレオチド配列は、配列番号５３から推定され、カーネルリポカリ

ンスーパーファミリーの成員（配列番号５７１）をコードする。これらの分泌糖タンパク質は、妊娠に適した子宮環境の調節、及び受精過程における適切な一連の事象の時期と発生において、明確且つ重要な役割を有する。正常組織及び癌組織における配列番号５７０の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５７２、５７３）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１３参照。配列番号５７０は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５７０は卵巣癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５７０及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６４】

配列番号５７４のヌクレオチド配列は、明らかなオープンリーディングフレームを有さない。正常組織及び癌組織における配列番号５７４の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５７５、５７６）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１４参照。配列番号５７４は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５７４は肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５７４及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６５】

配列番号５７７のヌクレオチド配列は、配列番号２０から推定された。配列番号５７７は、明らかなオープンリーディングフレームを有さない部分ｃＤＮＡである。正常組織及び癌組織における配列番号５７７の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５７８、５７９）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１５参照。配列番号５７７は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５７７は胃癌、乳癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５７７及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６６】

配列番号５８０のヌクレオチド配列は、配列番号３２から推定された。配列番号５８０は、明らかなオープンリーディングフレームを有さない部分ｃＤＮＡである。正常組織及び癌組織における配列番号５８０の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５８１、５８２）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１６参照。配列番号５８０は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５８０は卵巣癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５８０及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６７】

配列番号５８３のヌクレオチド配列は、配列番号２５７から推定され、転写因子のホメオボックスクラスの成員（配列番号５８４）をコードする。これらのタンパク質の発現は、胚発生の間に空間的及び時間的に調節される。正常組織及び癌組織における配列番号５８３の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５８５、５８６）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１７参照。配列番号５８３は胎盤及び前立腺において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５８３は結腸癌、卵巣癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５８３及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６８】

配列番号５８７のヌクレオチド配列は、配列番号１４８から推定され、ＩＧＦ－ＩＩｍＲＮＡ結合タンパク質（ＩＭＰ）ファミリーの成員（配列番号５８８）をコードする。インスリン様増殖因子２（ＩＧＦ２）ｍＲＮＡの５'ＵＴＲに結合して、ＩＧＦ２の翻訳を調節することによって機能する。正常組織及び癌組織における配列番号５８７の発現を

、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５８９、５９０）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１８参照。正常組織と比較して、配列番号５８７は肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５８７及びその発現産物は、標的治療のための、特にこの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２６９】

配列番号５９１のヌクレオチド配列は、配列番号１９４から推定され、未知の機能の３７２アミノ酸のタンパク質（配列番号５９２）をコードする。正常組織及び癌組織における配列番号５９１の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５９３、５９４）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図１９参照。配列番号５９１は精巣において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５９１は乳癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５９１及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７０】

配列番号５９５のヌクレオチド配列は、配列番号１９１から推定され、未知の機能の３５７アミノ酸のタンパク質（配列番号５９６）をコードする。正常組織及び癌組織における配列番号５９５の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号５９７、５９８）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２０参照。配列番号５９５は精巣において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５９５は胃癌、結腸癌、卵巣癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５９５及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

配列番号５９９のヌクレオチド配列は、配列番号１８から推定され、明らかなオープンリーディングフレームを有さない。正常組織及び癌組織における配列番号５９９の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６００、６０１）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２１参照。配列番号５９９は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号５９９は胃癌、乳癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号５９９及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７１】

配列番号６０２のヌクレオチド配列は、配列番号１３３から推定され、細胞外マトリックスタンパク質のフォンビルブラント因子ドメインスーパーファミリーの成員（配列番号６０３）をコードする。正常組織及び癌組織における配列番号６０２の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６０４、６０５）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２２参照。正常組織と比較して、配列番号６０２は卵巣癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号６０２及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７２】

配列番号６０６のヌクレオチド配列は、配列番号１２８から推定され、ＣＤＣ４２エフェクタータンパク質のＢｏｒｇファミリーの成員（配列番号６０７）をコードする。Ｂｏｒｇファミリーのタンパク質はＣＲＩＢ（Ｃｄｃ４２／Ｒａｃ相互作用性結合）ドメインを含む。それらはＣＤＣ４２に結合して、ＣＤＣ４２の機能を負に調節する。低分子量Ｒｈｏ　ＧＴＰアーゼであるＣＤＣ４２は、下流のエフェクタータンパク質との相互作用を介してＦアクチン含有構造体の形成を調節する。正常組織及び癌組織における配列番号６０６の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６０８、６０９）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２３参照。正常組織と比較して、配列番号６０６は胃癌、結腸癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配

列番号６０６及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７３】

配列番号６１０のヌクレオチド配列は、配列番号１１８から推定され、明らかなオープンリーディングフレームを有さない。正常組織及び癌組織における配列番号６１０の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６１１、６１２）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２４参照。正常組織と比較して、配列番号６１０は胃癌、乳癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号６１０及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７４】

配列番号６１３のヌクレオチド配列は、配列番号１１６から推定され、未知の機能の７６アミノ酸のタンパク質（配列番号６１４）をコードする。正常組織及び癌組織における配列番号６１３の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６１５、６１６）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２５参照。配列番号６１３は胎盤において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号６１３は乳癌、肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号６１３及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７５】

配列番号６１７のヌクレオチド配列は、配列番号２６７から推定された。配列番号６１７は、明らかなオープンリーディングフレームを有さない部分ｃＤＮＡである。正常組織及び癌組織における配列番号６１７の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６１８、６１９）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２６参照。配列番号６１７は胎盤及び子宮内膜において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号６１７は肺癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号６１７及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７６】

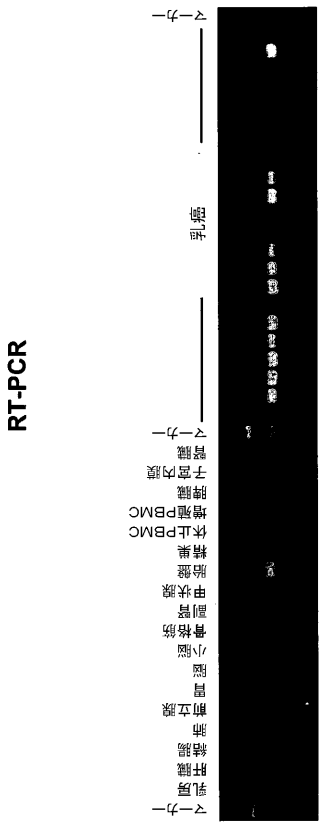
配列番号６２０のヌクレオチド配列は、配列番号１８２から推定され、多数の推定上の膜貫通ドメイン及びパッチドファミリードメインを保持する８２９アミノ酸のタンパク質（配列番号６２１）をコードする。膜貫通タンパク質パッチドは、形態形成因子（ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅ）、ソニックヘッジホッグ（Ｓｏｎｉｃ　Ｈｅｄｇｅｈｏｇ）に対する受容体である。このタンパク質は、スムーズンドタンパク質と結合してヘッジホッグシグナルを形質導入する。配列番号６２０はパッチドファミリーの新規成員であり得る。正常組織及び癌組織における配列番号６２０の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６２２、６２３）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２７参照。配列番号６２０は肺において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号６２０は卵巣癌及び黒色腫において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号６２０及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

【０２７７】

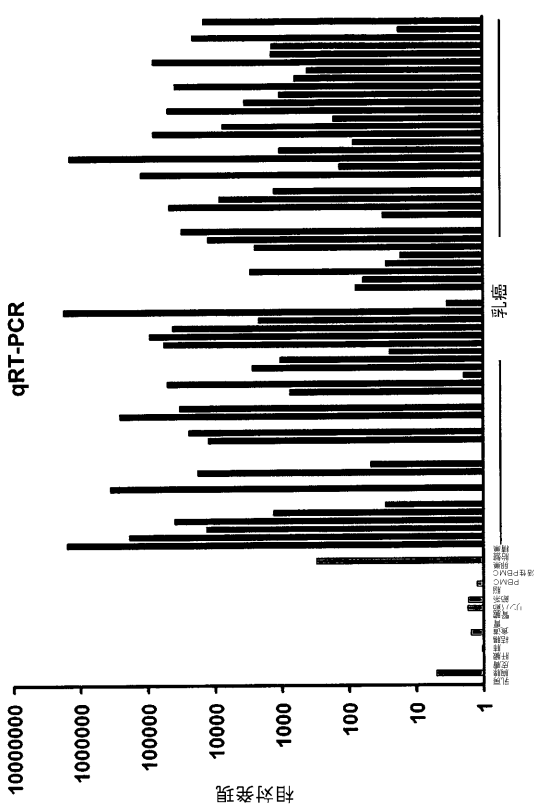
配列番号６２４のヌクレオチド配列は、配列番号１８４から推定され、２つの細孔形成Ｐドメインを含むカリウムチャネルタンパク質のスーパーファミリーの成員である、ＴＷＩＫ関連酸感受性K^+チャネルに類似する３２３アミノ酸のタンパク質（配列番号６２５）をコードする。正常組織及び癌組織における配列番号６２４の発現を、配列特異的オリゴヌクレオチド（配列番号６２６、６２７）を使用したリアルタイムＲＴ－ＰＣＲによって定量した；図２８参照。配列番号６２４は肺において高発現される。他の正常組織と比較して、配列番号６２４は胃癌及び肺癌において過剰発現される。これらの発現結果に基づき、配列番号６２４及びその発現産物は、標的治療のための、特にこれらの特定腫瘍型

のための分子マーカー及び／又は標的候補物質として適格である。

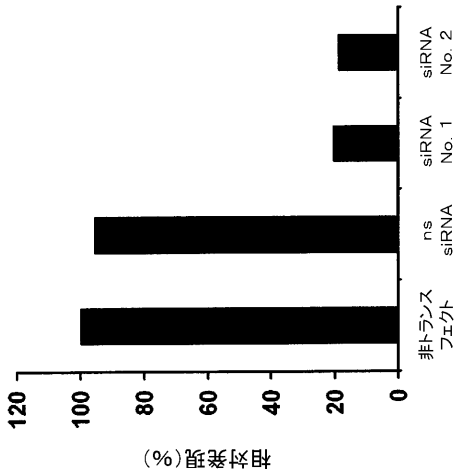
【図１】



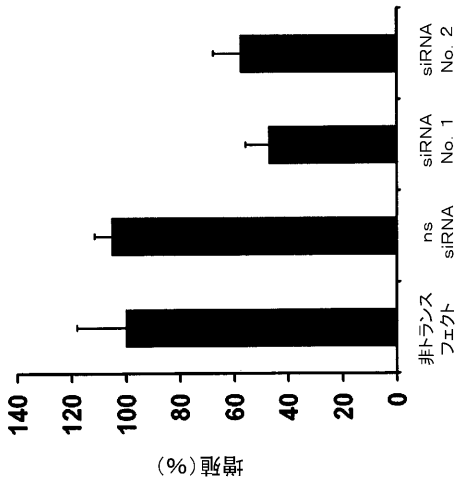
【図２】



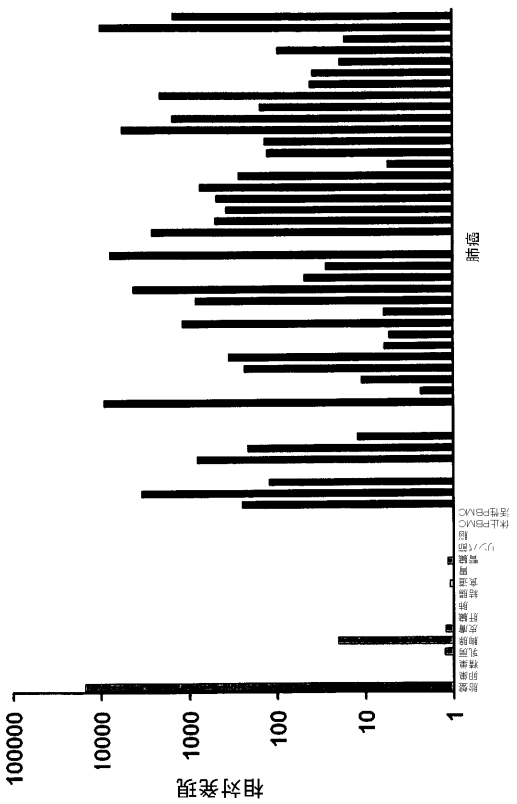
【図３】


相対発現(%)
120
100
80
60
40
20
0
非トランスフェクト
ns siRNA
siRNA No. 1
siRNA No. 2

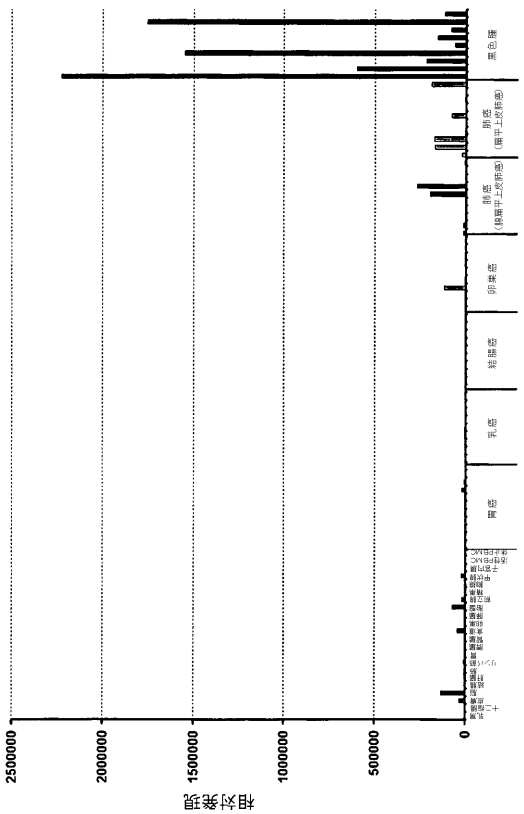
【図４】


増殖(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
非トランスフェクト
ns siRNA
siRNA No. 1
siRNA No. 2

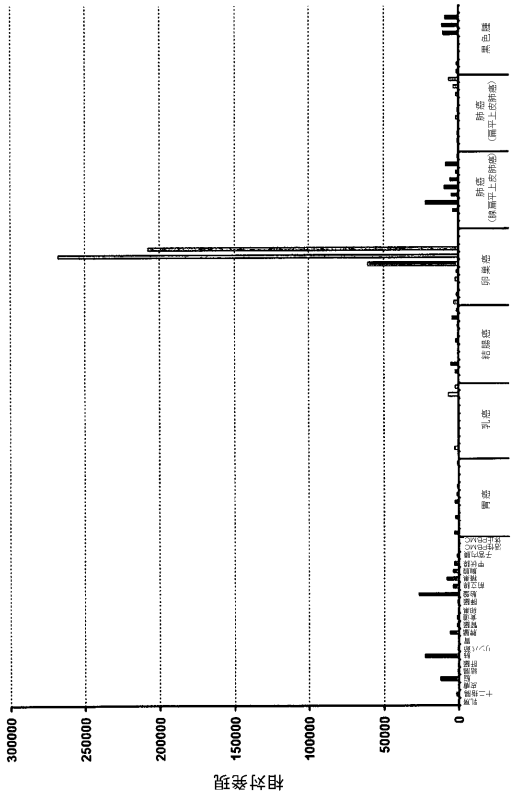
【図５】


相対発現
100000
10000
1000
100
10
1
膵臓
前立腺

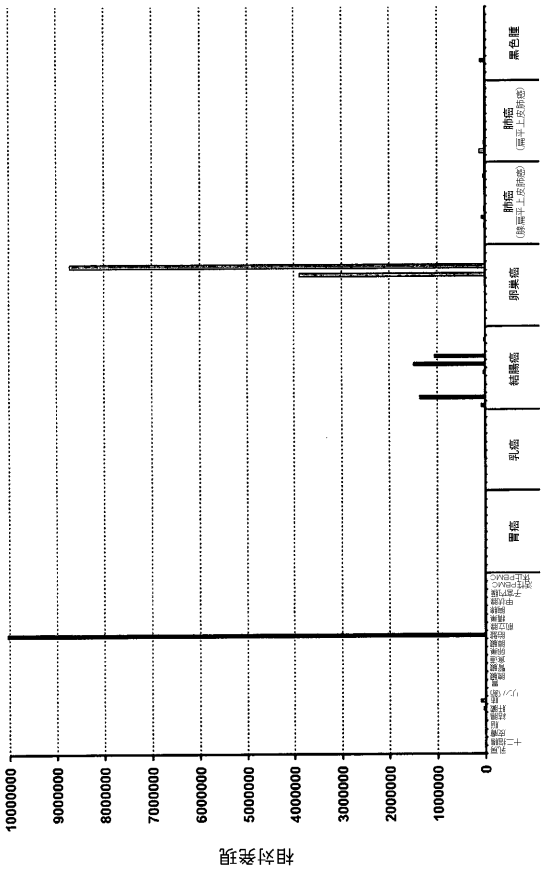
【図６】


相対発現
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
膵臓
前立腺

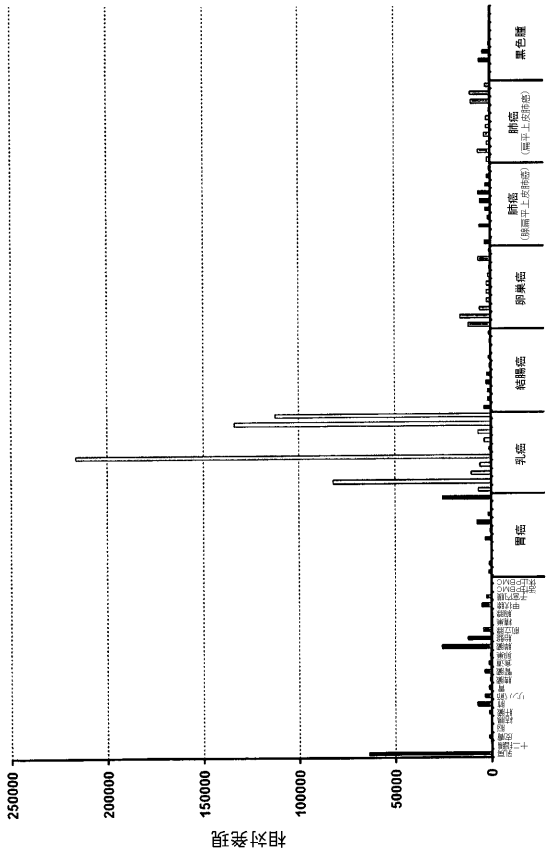
【図７】


相対発現
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
胃癌
乳癌
結腸癌
卵巣癌
肺癌
黒色腫

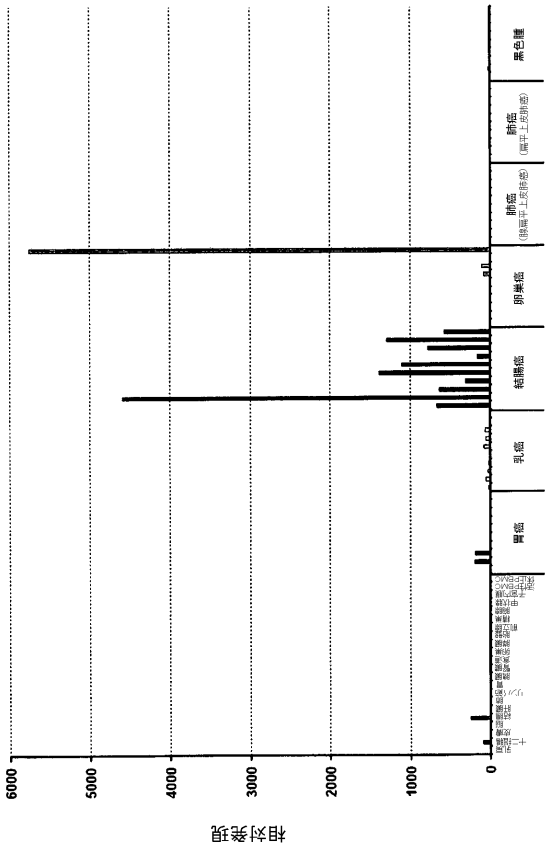
【図８】


相対発現
10000000
9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
胃癌
乳癌
結腸癌
卵巣癌
肺癌
黒色腫

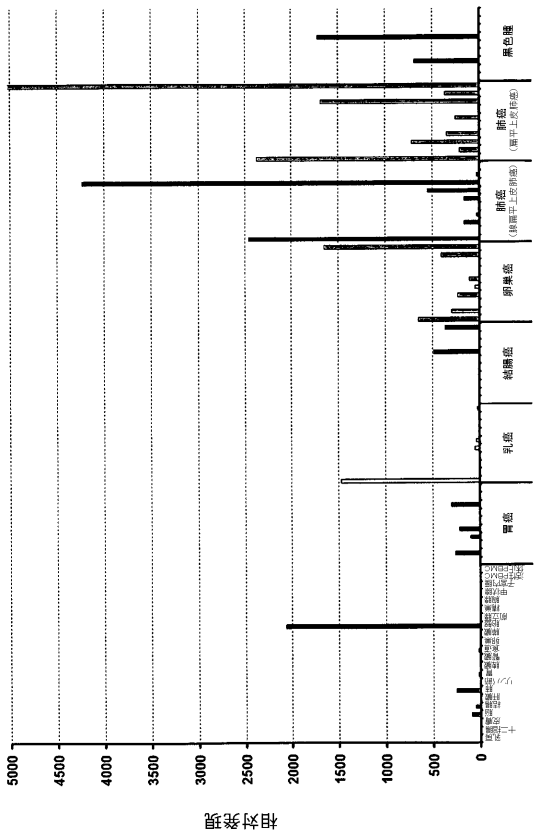
【図９】


相対発現
250000
200000
150000
100000
50000
0
胃癌
乳癌
結腸癌
卵巣癌
肺癌
黒色腫

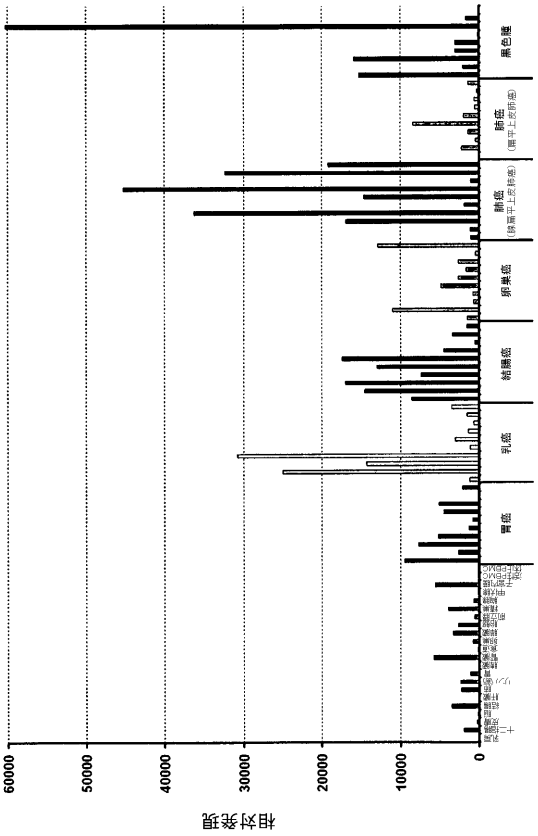
【図１０】


相対発現
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
胃癌
乳癌
結腸癌
卵巣癌
肺癌
黒色腫

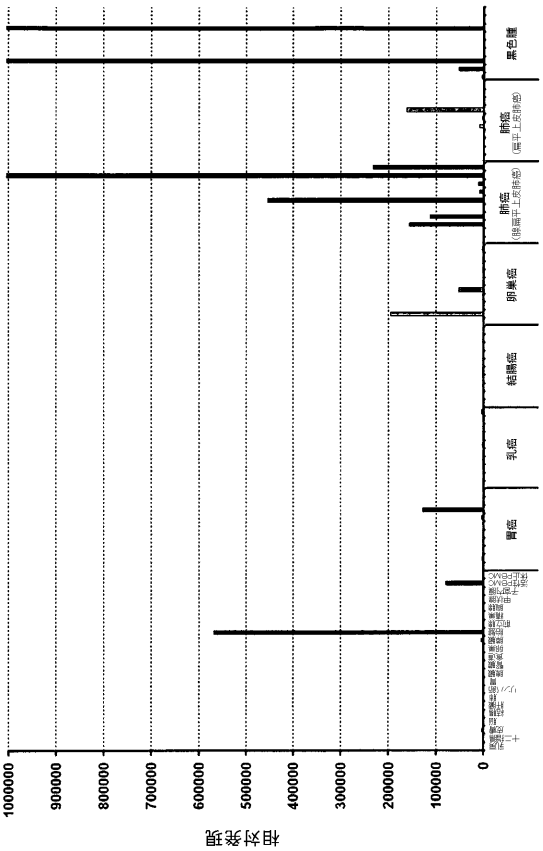
【図１１】



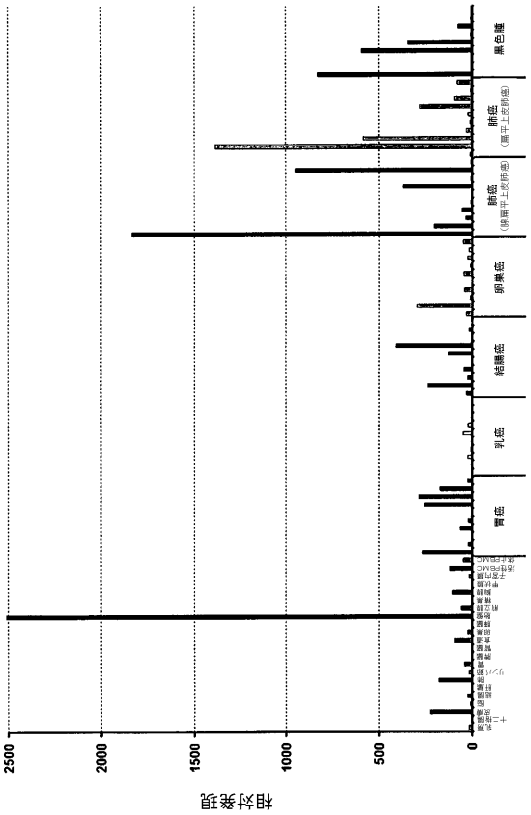
【図１２】



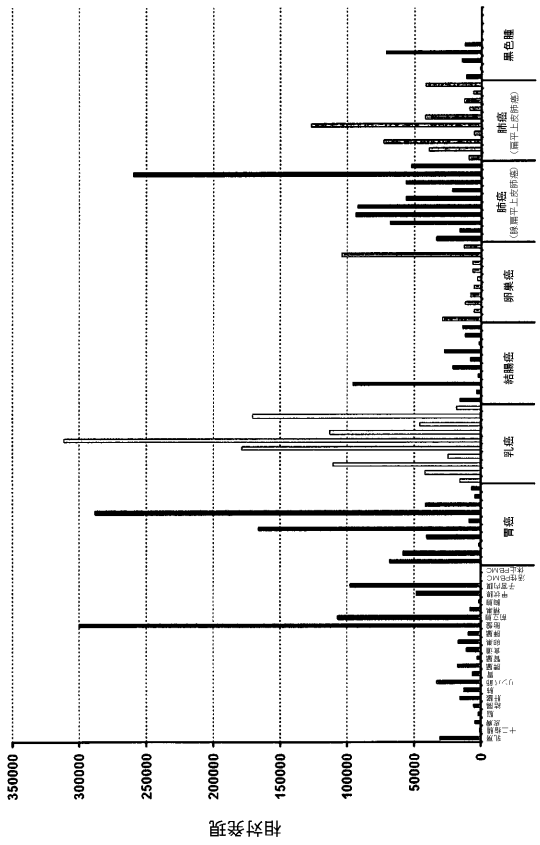
【図１３】



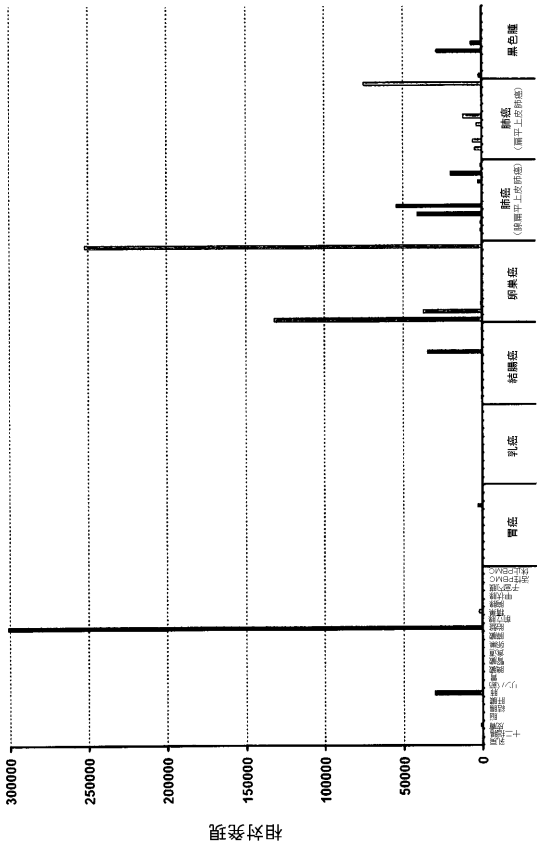
【図１４】



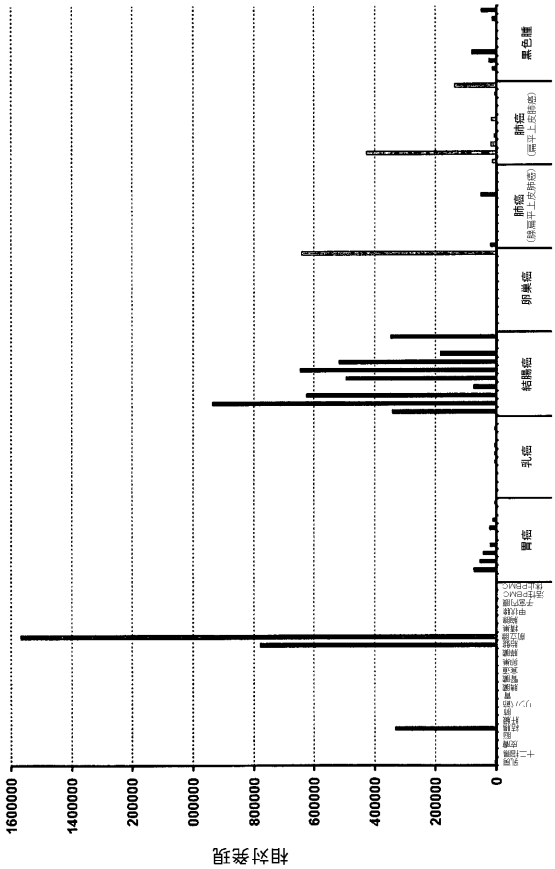
【図１５】



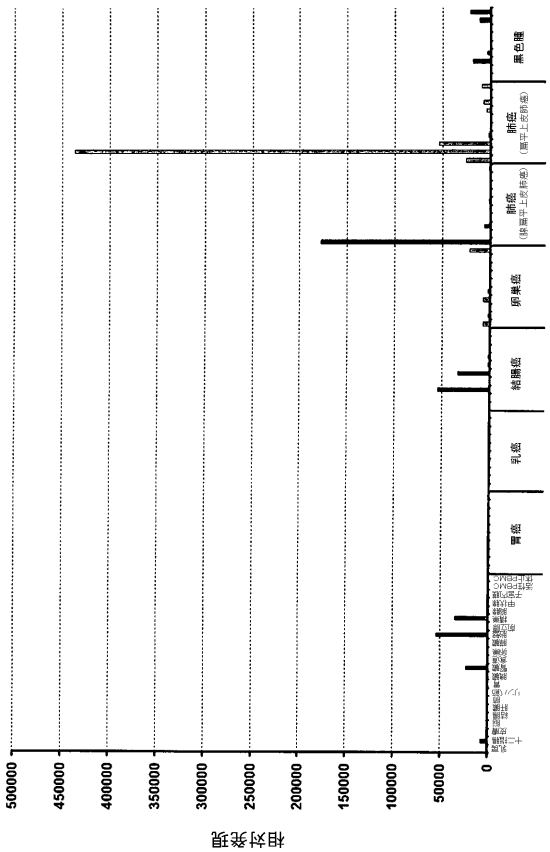
【図１６】



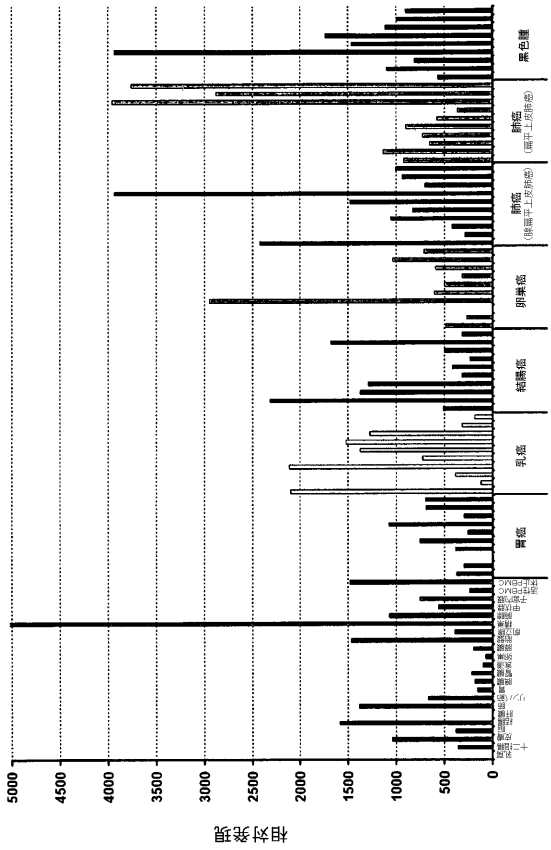
【図１７】



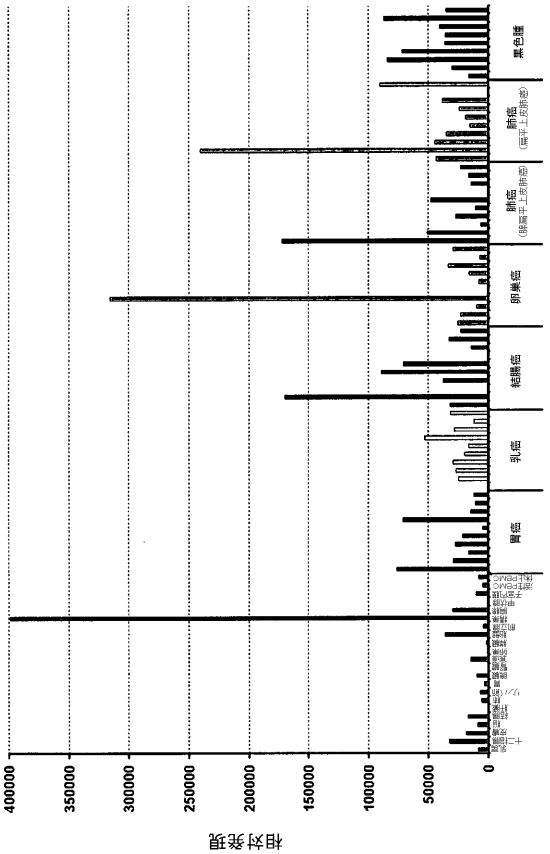
【図１８】



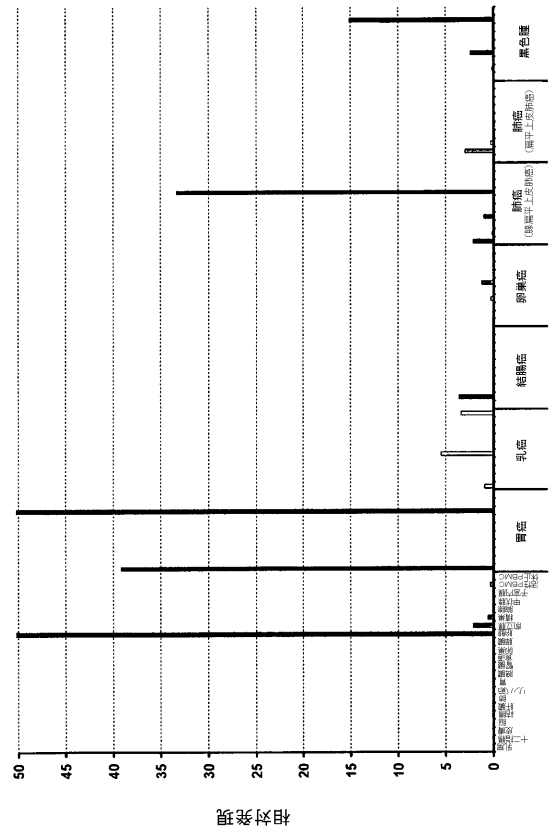
【図１９】



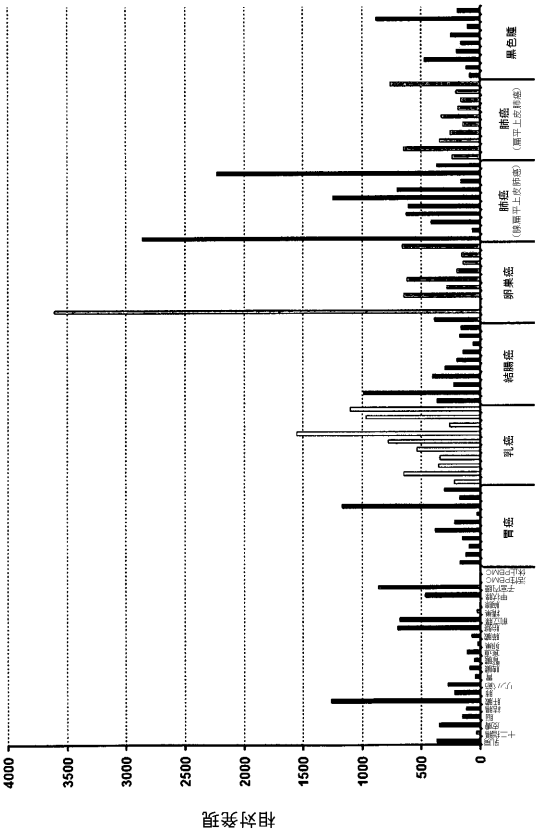
【図２０】



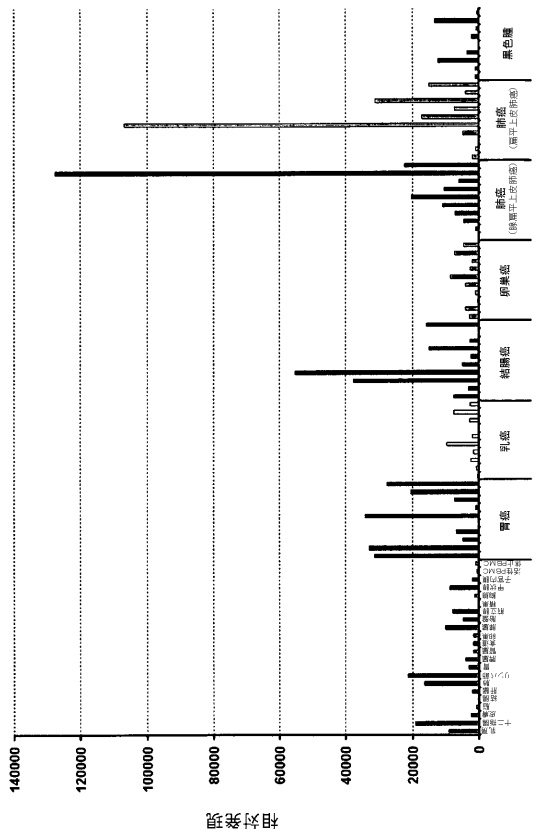
【図２１】



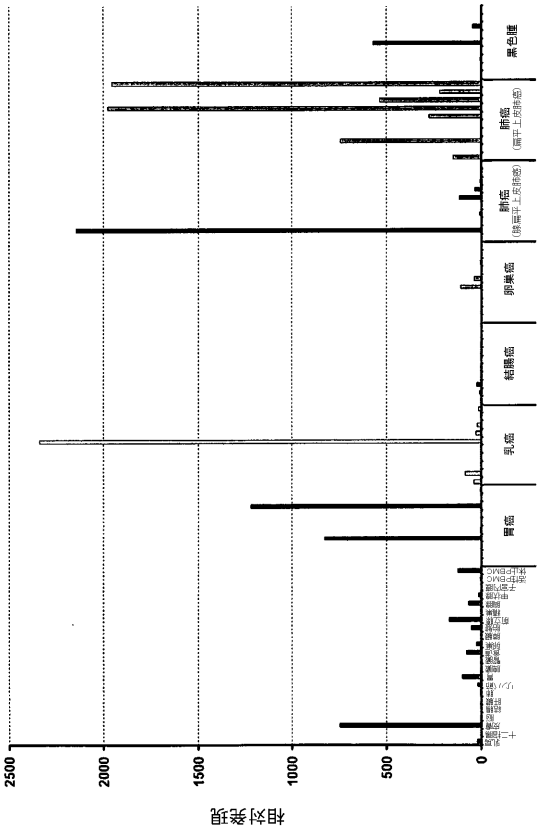
【図２２】



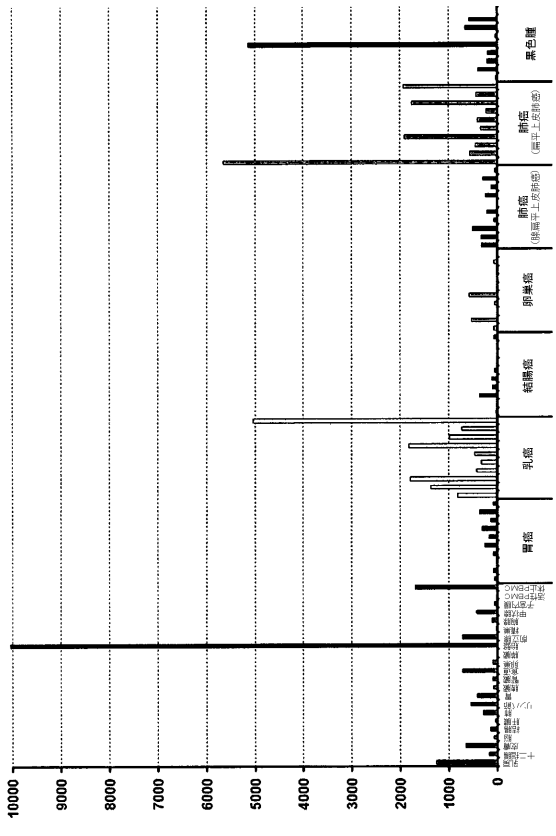
【図２３】



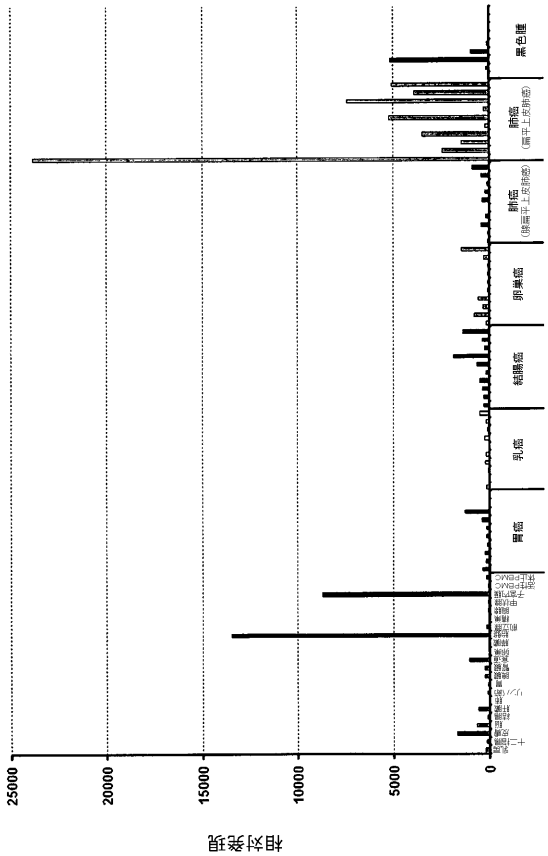
【図２４】



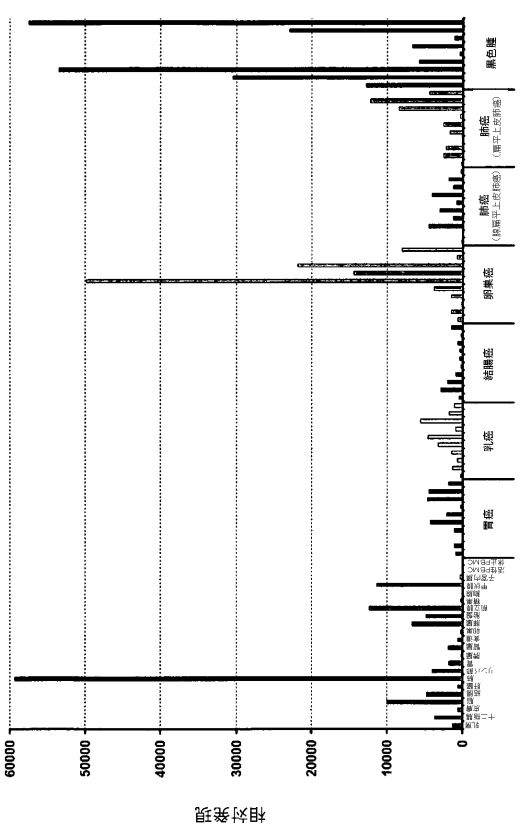
【図２５】



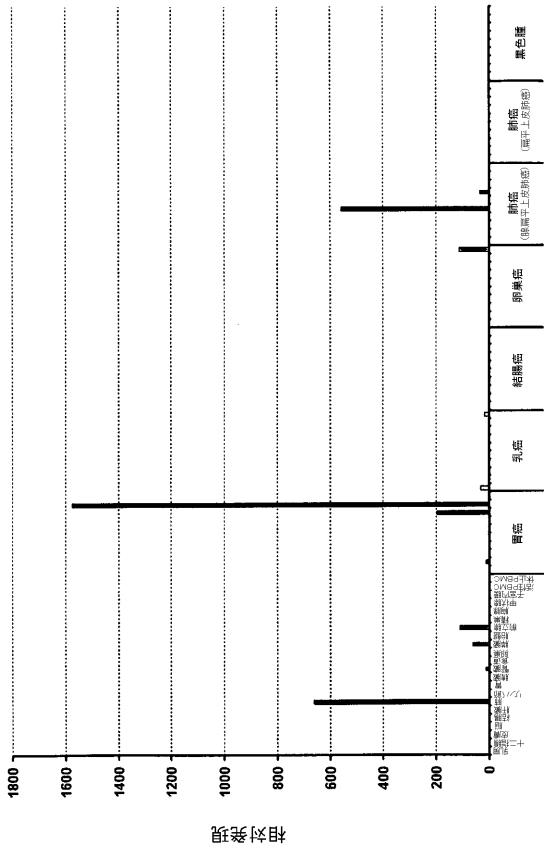
【図２６】



【図２７】



【図２８】



【配列表】

2011501758000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/008924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/031222 A2 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG [DE]; JOHANNES GUTENBERG UNI MAINZ V [DE];) 22 March 2007 (2007-03-22) the whole document	1-48
X	DATABASE GENESEQ [Online] 2 December 2004 (2004-12-02), LILLII J. ET AL.: "Novel isolated polypeptide associated with breast cancer" XP002518625 retrieved from EBI Database accession no. ACN90758 the whole document	1-48
X	US 2003/099974 A1 (LILLIE JAMES [US] ET AL) 29 May 2003 (2003-05-29) the whole document	1-48

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 March 2009	27/07/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Fax (+31–70) 340–3016	Novak-Giese, Sabine

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/008924

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/083986 A2 (RETARY DEPT OF HEALTH & HUMAN [US]; BARRRETT CARL [US]; RISS JOSEPH [U) 10 August 2006 (2006-08-10) the whole document	1-48
X	KOSLOWSKI M ET AL: "Frequent nonrandom activation of germ-line genes in human cancer" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 64, no. 17, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 5988-5993, XP002309835 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-48
Y	TÜRECI OZLEM ET AL: "Computational dissection of tissue contamination for identification of colon cancer-specific expression profiles." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY MAR 2003, vol. 17, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 376-385, XP002471061 ISSN: 1530-6860 the whole document	1-48
Y	WO 2006/100089 A2 (GANYMED PHARMACEUTICALS AG [DE]; SAHIN UGUR [DE]; TUERECI OEZLEM [DE];) 28 September 2006 (2006-09-28) the whole document	1-48
Y	PROKOPENKO P G ET AL: "Antigenic structure of ovarian cancer metastases." BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE JUN 2001, vol. 131, no. 6, June 2001 (2001-06), pages 561-563, XP002471062 ISSN: 0007-4888 the whole document	1-48

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/008924

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 32 and 38; Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2008/008924

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-48 (partially):

Invention 1:
A pharmaceutical composition comprising a tumor-associated antigen, having a sequence encoded by a nucleic acid which is characterized by SEQ ID NO: 541.
Also encompassed are methods to use these antigens.

Inventions 2-564: Claims 1-48 (partially)

A pharmaceutical composition comprising a tumor-associated antigen, having a sequence encoded by a nucleic acid which is characterized by SEQ ID NO: 1-540, 545,549,553,557,560,563,566,570,574,577,580,583,587,591,595, 599,602,606,610,613,617,620,624.
Also encompassed are methods to use these antigens.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/008924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007031222 A2	22-03-2007	AU 2006291717 A1	22-03-2007
		CA 2620712 A1	22-03-2007
		CN 101305020 A	12-11-2008
		EP 1762575 A1	14-03-2007
		JP 2009507868 T	26-02-2009
		KR 20080052664 A	11-06-2008
US 2003099974 A1	29-05-2003	NONE	
WO 2006083986 A2	10-08-2006	CA 2596469 A1	10-08-2006
		EP 1846576 A2	24-10-2007
WO 2006100089 A2	28-09-2006	DE 102005013846 A1	05-10-2006
		EP 1861118 A2	05-12-2007
		JP 2008537546 T	18-09-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K 16/46		4H045
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P 35/00		
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K 48/00		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K 39/395	T	
A61K 35/14	*(2006.01)*	A61K 35/14	Z	
G01N 33/574	*(2006.01)*	G01N 33/574	Z	
		G01N 33/574	A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100110928
弁理士 速水 進治
(72)発明者 サヒン, ウグル
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ フィリップ フォン ツァベルン プラッツ １
(72)発明者 テューレヒ, エズレム
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ フィリップ フォン ツァベルン プラッツ １
(72)発明者 コスロフスキー, ミヒャエル
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ カイザーシュトラーセ ７２

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 BA80 CA04 CA11 DA02 HA12 HA15 HA17
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QQ58 QR55 QS33 QS34
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA14 AA15 AA16 BB01 CC23 DD61 DD62 DD63 EE01
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA75 EA22 FA72 FA74